

Aus der Klinik für Kleintiere  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und der

Universitätsklinik für Strahlentherapie  
der Medizinischen Universität Wien

**Modifikation der Strahlenreaktion der  
Mundschleimhaut (Maus) durch Hemmung der  
Stickstoffmonoxid-Synthase mittels  
nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von

**Jessica Schöllner**

aus Erfurt

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan:	Prof. Dr. Manfred Coenen
Betreuer:	Priv.-Doz. Dr. med. vet. Eberhard Ludewig Prof. Dr. med. vet. et rer. medic. habil. Wolfgang Dörr
Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. med. vet. Eberhard Ludewig, Klinik für Kleintiere, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig Prof. Dr. med. vet. et rer. medic. habil. Wolfgang Dörr, Universitätsklinik für Strahlentherapie der Medizinischen Universität, Wien Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Günter Lauer, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Dresden

Tag der Verteidigung: 25. August 2015

***Tumours*** are space filling lesions  
For the cell growth we don't know the reasons  
They expand and can spread  
From the toe to the head  
They're the host's own parts guilty of reason.

(Sobin, 1978)

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<u>A</u> bbildung
ALA	5- <u>A</u> mino <u>l</u> evulinic- <u>a</u> cid
bid	zweimal täglich
biw	zweimal wöchentlich
CPT	<u>C</u> arbop <u>l</u> at <u>i</u> n
cGMP	<u>c</u> yclic <u>g</u> uanosine <u>m</u> onophosphate
cDDP	Cisplatin oder <u>D</u> iamin- <u>d</u> ichlorido- <u>p</u> latin
CR	komplette Remission
ChT	<u>C</u> hemo <u>t</u> herapie
D	Strahlendosis
D <sub>0</sub>	mittlere Überlebensdosis
DEGRO	<u>D</u> eutsche <u>G</u> esellschaft für <u>R</u> adio <u>o</u> nkologie e.V.
DMF	<u>D</u> osis- <u>M</u> odifikations- <u>F</u> aktor
Dox	<u>D</u> oxorubicin
EB	<u>E</u> inzeit <u>b</u> estrahlung
ED <sub>50</sub>	Dosis, bei der bei 50 % der Tiere ein Ulkus zu erwarten ist
EDRF	<u>E</u> ndothelium- <u>d</u> erived <u>r</u> elaxing <u>f</u> actor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid(NO-)-Synthase oder NOS-III
FeLV	<u>F</u> elines <u>L</u> eukose <u>V</u> irus
FIP	<u>F</u> eline <u>i</u> nfektiöse <u>P</u> eritonitis
FIV	<u>F</u> elines <u>I</u> mmundefizienz <u>V</u> irus
FORL	<u>F</u> eline <u>o</u> dontoklastische <u>r</u> esorptive <u>L</u> äsion
FSA	<u>F</u> ibros <u>a</u> rkom
FSU	<u>f</u> unctional <u>s</u> ub <u>u</u> nit
GEKID	<u>G</u> esellschaft der <u>e</u> pidemiologischen <u>K</u> rebsregister <u>i</u> n <u>D</u> eutschland
HE	<u>H</u> ämatoxylin- <u>E</u> osin-Färbung
HIF-1 $\alpha$	<u>h</u> ypoxia- <u>i</u> nducible <u>f</u> actor 1 $\alpha$
IFN- $\gamma$	<u>I</u> nter <u>f</u> eron- $\gamma$
IL-1 $\beta$	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin-1 $\beta$
iNOS	<u>i</u> nduzierbare Stickstoffmonoxid(NO-)-Synthase oder NOS-II
i.p.	<u>i</u> ntra <u>p</u> eritoneal
i.r.	<u>i</u> ntra <u>r</u> ektal
k <sub>i</sub>	Gleichgewichtsdissoziationskonstante, auch Inhibitionskonstante, Konzentration des Inhibitors bei der 50% der aktiven Tasche besetzt ist
k.A.	<u>k</u> eine <u>A</u> ngaben
L-NAME	N5-[imino( <u>n</u> itro <u>a</u> mino)methyl]- <u>L</u> -ornithine, <u>m</u> ethylester, monohydrochlorid
L-NNA	<u>N</u> <sup>G</sup> - <u>N</u> itro- <u>L</u> - <u>A</u> rginin (biologisch inaktive Vorstufe ist L-NAME)

---

LPS	<u>L</u> ipopolysaccharide
LR	<u>L</u> okalre <u>z</u> idiv
Me	<u>M</u> elphalan
Multimod	<u>M</u> ultimodale Therapie
MÜZ	<u>m</u> ittlere <u>Ü</u> berlebens <u>z</u> eit
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
NADP <sup>+</sup>	<u>N</u> icotinsäureamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid- <u>P</u> hosphat
NADPH	Derivat von NADP <sup>+</sup>
n.b.	<u>n</u> icht <u>b</u> erechnet
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen
nNOS	<u>n</u> euronale Stickstoffmonoxid-Synthase oder NOS-I
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OS	<u>O</u> steosarkom
PEK	<u>P</u> lattenepithel <u>k</u> arzinom
PR	<u>p</u> artielle <u>R</u> emission
rHuKGF	<u>r</u> ekombinanter <u>h</u> umaner <u>K</u> eratinozyten Wachstumsfaktor ( <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
RKI	<u>R</u> obert- <u>K</u> och- <u>I</u> nstitut
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies
RS	<u>R</u> adiosensitizer
RT	<u>R</u> adio <u>t</u> herapie
S	Chirurgie (engl. <u>S</u> urgery)
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SF	<u>s</u> urviving <u>f</u> raction (Überlebensrate)
SF2	Überlebensrate der Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy
SPF	<u>s</u> pezifiziert- <u>p</u> athogen <u>f</u> rei
TNBS	2,4,6- <u>T</u> ri <u>n</u> itrobenzol- <u>S</u> äure
VCS	<u>V</u> et <u>C</u> ancer <u>S</u> ociety
VSSO	<u>V</u> eterinary <u>S</u> ociety of <u>S</u> urgical <u>O</u> ncology
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>4</b>
2.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen . . . . .	4
2.2 Multimodale Tumorbehandlung . . . . .	6
2.3 Strahlentherapie und Behandlungsprotokolle in der Tiermedizin . . .	7
2.3.1 Bestrahlungsarten . . . . .	8
2.3.1.1 Externe Bestrahlung . . . . .	8
2.3.1.2 Brachytherapie . . . . .	8
2.3.1.3 Nuklearmedizinische Therapie . . . . .	9
2.3.2 Bedeutung . . . . .	9
2.3.3 Kurative Bestrahlungsprotokolle in der Tiermedizin . . . . .	10
2.3.4 Palliative Bestrahlungsprotokolle . . . . .	10
2.3.5 Strahlentherapie nicht-onkologischer Erkrankungen . . . . .	11
2.3.6 Tumoren der Maulhöhle beim Hund . . . . .	11
2.3.7 Tumoren der Mundhöhle bei der Katze . . . . .	15
2.4 Nebenwirkungen der Strahlentherapie . . . . .	16
2.4.1 Frühe Strahlenreaktionen . . . . .	16
2.4.2 Chronische Strahleneffekte . . . . .	17
2.4.3 Konsekutive/späte Strahlenfolgen . . . . .	17
2.4.4 Frühe Strahlenreaktionen im Kopf-Hals-Bereich . . . . .	18
2.4.5 Späte Strahlenreaktionen im Kopf-Hals-Bereich . . . . .	19
2.5 Einflußfaktoren der Strahlenempfindlichkeit . . . . .	22
2.5.1 Intrinsische Strahlenempfindlichkeit . . . . .	22
2.5.2 Erholung (Recovery) . . . . .	24
2.5.3 Repopulierung . . . . .	25
2.5.4 Redistribution . . . . .	25
2.5.5 Reoxygenierung . . . . .	26
2.5.6 Bestrahltes Organvolumen . . . . .	26
2.6 Aufbau und Proliferationskinetik der Mundschleimhaut . . . . .	27
2.6.1 Anatomie und Histologie der Zunge . . . . .	27
2.6.2 Besonderheiten der humanen Mundschleimhaut . . . . .	28
2.6.3 Besonderheiten der kaninen Mundschleimhaut . . . . .	28
2.6.4 Besonderheiten der felines Mundschleimhaut . . . . .	28
2.6.5 Besonderheiten der murinen Mundschleimhaut . . . . .	29
2.7 Verlauf und molekulare Pathogenese der radiogenen oralen Mukositis . . . . .	31

2.8	Stickstoffmonoxid . . . . .	32
2.8.1	Eigenschaften . . . . .	32
2.8.2	NO-Synthese und iNOS-Aktivierung . . . . .	32
2.8.3	Funktionen von NO . . . . .	34
2.9	L-NAME . . . . .	35
2.10	Zielstellung der Arbeit . . . . .	36
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
3.1	Tierexperimentelle Untersuchungen . . . . .	37
3.1.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung . . . . .	37
3.1.1.1	Versuchstiere . . . . .	37
3.1.1.2	Versuchstierhaltung . . . . .	37
3.1.2	Bestrahlungstechniken und Dosimetrie . . . . .	38
3.1.2.1	Perkutane Bestrahlung . . . . .	39
3.1.2.2	Lokale Bestrahlung der Zungenunterseite . . . . .	40
3.1.3	Klinische Beurteilung der Strahlenreaktion . . . . .	41
3.1.3.1	N5-[IMINO(NITROAMINO)METHYL]-L-ORNITHINE, ME- THYLESTER, MONO- HYDROCHLORIDE (L-NAME) . . . . .	42
3.1.4	Beschreibung der Experimente . . . . .	42
3.1.4.1	Alleinige L-Name-Gabe . . . . .	43
3.1.4.2	Lokale Einzeitbestrahlung . . . . .	43
3.1.4.3	Fraktionierte Bestrahlung über 1 Woche . . . . .	44
3.1.4.4	Fraktionierte Bestrahlung über 2 Wochen . . . . .	44
3.1.5	Statistische Auswertung . . . . .	45
3.1.5.1	Dosis-Effekt-Beziehungen . . . . .	45
3.1.5.2	Zeitlicher Verlauf der makroskopischen Strahlenre- aktion . . . . .	45
3.2	Histologische Untersuchungen . . . . .	46
3.2.1	Bestrahlungsprotokolle . . . . .	46
3.2.2	Zungenentnahme und Fixierung . . . . .	46
3.2.3	HE-Färbung . . . . .	46
3.2.4	Beurteilung der histologischen Schnitte . . . . .	47
3.2.5	Statistische Auswertung . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1	Lokale Einzeitbestrahlung . . . . .	48
4.1.1	Klinische Symptomatik der Strahlenreaktion . . . . .	48
4.1.2	Zeitlicher Verlauf . . . . .	49
4.1.3	Dosisabhängigkeit der Ulkuszinzidenz . . . . .	51
4.1.4	Gewichtsverlauf . . . . .	52
4.2	Alleinige L-NAME-Applikation . . . . .	53
4.3	Einfluss von L-NAME bei Einzeitbestrahlung . . . . .	53
4.3.1	Dosisabhängigkeit der Ulkuszinzidenz . . . . .	54
4.3.2	Zeitlicher Verlauf . . . . .	55
4.4	Einfluss von L-NAME auf das Zungenepithel bei Bestrahlung mit 5×3Gy/Woche . . . . .	55
4.4.1	Dosisabhängigkeit der Ulkushäufigkeit . . . . .	56
4.4.2	Zeitlicher Verlauf . . . . .	57

4.5	Einfluss von L-NAME bei Bestrahlung mit $10 \times 3 \text{ Gy}/2$ Wochen . . . .	58
4.5.1	Dosisabhängigkeit . . . . .	58
4.5.2	Zeitlicher Verlauf . . . . .	59
4.6	Histologische Untersuchungen . . . . .	60
4.6.1	Morphologische Veränderungen . . . . .	60
4.6.2	Quantitative Analysen . . . . .	62
4.6.2.1	Unbestrahtes, unbehandeltes Zungenepithel . . . . .	62
4.6.2.2	Bestrahlung mit $10 \times 3 \text{ Gy}/2$ Wochen; Wirkung von L-NAME . . . . .	62
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
5.1	Klinischer Hintergrund . . . . .	68
5.2	Bedeutung der radiogenen Mucositis enoralis . . . . .	68
5.3	Molekulare Grundlagen der radiogenen Mucositis enoralis . . . . .	69
5.4	Tiermodell der Zungenunterseite der Maus . . . . .	70
5.5	Einfluss von L-NAME auf die Strahlenre- aktion der Mundschleimhaut (Maus) . . . . .	72
5.5.1	Strahlenempfindlichkeit und zeitlicher Verlauf . . . . .	73
5.5.2	Histologische Veränderungen . . . . .	73
5.5.3	Wirkmechanismen von L-NAME . . . . .	73
5.6	Inhibition von iNOS durch L-NAME . . . . .	74
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>98</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>105</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>106</b>



# 1. Einleitung

Im Jahr 2011 erkrankten in Deutschland insgesamt 483.478 Menschen an Krebs (GEKID 2011). Das Lebenszeitrisko, d.h. die Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens an Krebs zu erkranken, liegt für Männer mit 50,7 % etwas höher als für Frauen (42,8 %) (KLASEN 2012). In den letzten Jahren zeigt sich eine stetig steigende Inzidenz für Tumorerkrankungen. Schätzungen für das Jahr 2050 beinhalten eine Zunahme der Krebserkrankungen um 30 Prozent (RKI 2010). In den Industrieländern werden mehrere Ursachen hierfür diskutiert, u.a. die Qualität des Gesundheitssystems. Hierdurch steigt die durchschnittliche Lebenserwartung und damit auch die Gefahr an altersassoziierten Erkrankungen, wie Krebs, zu erkranken.

In Deutschland sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache. 2010 starben davon 118.202 Männer (28,9 %) und 100.867 Frauen (22,4 %) (RKI und GEKID 2013). Für das Jahr 2030 wird prognostiziert, dass 13,2 Millionen Menschen weltweit an einer krebsassoziierten Erkrankung sterben (BRAY et al. 2012).

Die Relevanz von Krebserkrankungen steigt auch in der Tiermedizin, vor allem auf Grund der steigenden Rate an Neudiagnosen (CIAPUTA et al. 2013, NOWAK et al. 2010). Diese Entwicklung reflektiert zum Einen die stetig wachsende Zunahme der Erkrankung, zum Anderen spiegelt sie die Spezialisierung in der Tiermedizin, einhergehend mit einer verbesserten Diagnostik, und die zunehmende Besitzersensibilität wieder (NOWAK et al. 2010). Die höchste Tumorzinzidenz für Hunde liegt zwischen dem 9. und 11. Lebensjahr, für Katzen zwischen dem 7. und 11. Lebensjahr (VASCELLARI et al. 2009, CIAPUTA et al. 2013). Beim Hund ist Krebs die häufigste krankheitsbedingte Todesursache (THORPE-VAGAS 2013). Nahezu 50 % der Hunde über 10 Jahre sterben durch eine krebsassoziierte Erkrankung (KASERHOTZ et al. 1994).

Die Ätiologie von Kopf-Hals-Tumoren ist multifaktoriell. In der Tiermedizin werden als Hauptrisikofaktoren der Einfluss von Kanzerogenen (z.B. ein Tier im Raucher-

haushalt), Virusinfektionen (z.B. Papilloma-Virus, chronische Gingivitis nach Katzenschnupfen), Immunsuppression [Felines Leukose-Virus (FeLV)/ Felines Immundefizienz-Virus (FIV)/ Feline infektiöse Peritonitis (FIP)], genetische Rasseprädisposition, schlechte Maulhygiene und chronische Schleimhautläsionen [v.a. bei Katzen in Verbindung mit FORL (feline odontoklastische resorptive Läsion)] diskutiert.

Nach der Diagnostik eines Malignoms wird aus den drei Grundsäulen der Tumorthherapie (Chirurgie, Chemo-, Strahlentherapie) ein Behandlungsregime zusammengestellt. In Abhängigkeit von Tumorlokalisation, -ausdehnung, -entität und Begleiterkrankungen erhält der Patient einen individuellen Behandlungsplan. Der Strahlentherapie kommt bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich eine besondere Bedeutung zu.

Trotz sorgfältiger Planung des Bestrahlungsvolumens wird bei einer effektiven Strahlentherapie immer gesundes Gewebe mit signifikanten Strahlendosen exponiert. Dies betrifft Strukturen im Tumor (Gefäße, Bindegewebe), in dessen unmittelbarer Umgebung und in den Ein- und Austrittskanälen der Strahlung. Aus diesem Grund geht eine kurative Strahlentherapie immer mit einem (akzeptierten) Risiko von Nebenwirkungen einher. Diese sind u.a. abhängig von dem bestrahlten Gewebe, der Dosis pro Fraktion und der Gesamtbehandlungszeit. Eine der gravierendsten und häufig dosislimitierenden Nebenwirkungen der Strahlentherapie von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches ist die radiogene Mucositis enoralis (DÖRR et al. 2000, RABER-DURLACHER et al. 2010, ROSENTHAL und TROTTI 2009, SCARDINA et al. 2010). Beinahe alle Patienten, welche einer Radiotherapie von Kopf-Hals-Tumoren unterzogen werden, entwickeln eine orale Mukositis (KEEFE 2006).

Die radiogene Mucositis enoralis ist eine typische frühe Strahlenreaktionen an einem Umsatzgewebe. Bei konventioneller Therapie mit  $5 \times 2$  Gy/Woche kommt es bereits zu Beginn der zweiten Behandlungswoche zu einer Rötung und Schwellung der Mundschleimhaut. Im weiteren Verlauf manifestieren sich lokale Erosionen, welche sich zu einer konfluierenden, pseudomembranösen Mukositis entwickeln können (DÖRR et al. 2010). Die konfluenten Veränderungen entstehen ca. 9 Tage nach Applikation einer Schwellendosis von 20 Gy (Van der SCHUEREN et al. 1990). Sie heilen nach Beendigung der Strahlentherapie innerhalb einiger Wochen meist vollständig aus (HERRMANN et al. 2006a, DÖRR et al. 2010).

Die schmerzhafteste Mucositis enoralis, in Verbindung mit Xerostomie und Geschmacksveränderungen, beeinträchtigt den Allgemeinzustand und die Lebensqualität des Patienten während und kurz nach der Therapie erheblich (DÖRR et al. 2007). Nicht selten muss die Therapie aufgrund der Nebenwirkungen für einige Tage bis Wochen unterbrochen werden; hiermit geht eine schlechtere lokale Tumorheilungschance einher (HERRMANN und BAUMANN 2005). Die Ausbildung von frühen Strahlenreaktionen beeinflusst das Risiko für chronische Strahleneffekte in Form von konsekutiven

Spätfolgen (HERRMANN et al. 2006c, DÖRR und HENDRY 2001, DÖRR 2006b, DÖRR 2009a). Die Vermeidung der Mucositis enoralis ist auch aus sozioökonomischer Sicht von Bedeutung. Die Kosten durch Hospitalisation und symptomatische Therapie steigen in der Humanmedizin durch die Schleimhautreaktion um mehrere tausend Euro/Patient (ELTING et al. 2008).

Der Prophylaxe und Therapie der radiogenen oralen Schleimhautreaktionen kommt somit eine grundlegende Bedeutung zu. Es existiert diesbezüglich eine Vielzahl an experimentellen und klinischen Ansätzen. Jedoch hat bisher noch kein spezifisches biologisch begründetes Konzept Eingang in den klinischen Alltag gefunden - ein Hinweis auf mangelnde Wirksamkeit oder Durchführbarkeit (DEGRO 2006, DÖRR et al. 2007, 2008, 2010). Lediglich allgemeine Maßnahmen, wie optimale Mundhygiene, Mundspülungen, eine adäquate Schmerzbehandlung und (falls nötig) eine antimykotische/-bakterielle Therapie werden empfohlen (DÖRR et al. 2010).

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein parakriner Botenstoff. Die Bildung erfolgt durch NO-Synthasen aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird auf transkriptioneller Ebene durch verschiedene Stimuli induziert. Zellen der unspezifischen Immunabwehr, wie Makrophagen, produzieren iNOS. Die strahleninduzierte Aktivierung von Makrophagen im Rahmen der Schleimhautreaktion wurde ebenso wie die Gefäßdilatation bereits nachgewiesen (JAAL et al. 2010). Somit liegt eine Beteiligung von NO in Folge einer iNOS-Aktivierung im Rahmen der Pathogenese der oralen Mukositis nach Strahlenexposition nahe. L-NAME (nitro-L-Arginin-Methyl-Ester) ist ein unspezifischer Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).

Zu der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der iNOS-Inhibierung mittels L-NAME auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut nach ein- bzw. zweiwöchig fraktionierter Bestrahlung im etablierten Tiermodell der Zungenunterseite der Maus untersucht. Als klinisch relevanter Endpunkt wurde das Auftreten von Ulzerationen analysiert. In weiterführenden histologischen Untersuchungen erfolgte die Quantifizierung der epithelialen Zellzahlen und Schichtdicken.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen

Im Jahr 2011 erkrankten in Deutschland insgesamt 483.478 Menschen an Krebs (GEKID 2011). Schätzungen des Robert-Koch-Instituts Berlin rechnen für das Jahr 2014 mit Neuerkrankungen von 264.700 Männern und 236.200 Frauen in Deutschland (RKI 2014); weitergehende Schätzungen für das Jahr 2050 beinhalten eine Zunahme der Krebserkrankungen um 30 Prozent (RKI 2010). Die häufigste Krebsart beim Mann ist mit 57.600 Neuerkrankungen jährlich der Prostatakrebs, gefolgt von Darmkrebs (38.300 Neuerkrankungen jährlich) und Lungenkrebs (33.700 Neuerkrankungen jährlich) (RKI und GEKID 2013). Bei den Frauen ist mit einer Neuerkrankungsrate von 74.500 Fällen der Brustkrebs der häufigste Tumor, an zweiter Stelle steht ebenfalls der Darmkrebs (31.100 Neuerkrankungen) gefolgt von 17.700 Neuerkrankungen mit Lungenkrebs (RKI und GEKID 2013). An Malignomen des Mund-Rachenbereiches erkrankten 2010 9340 Männer und 3490 Frauen (RKI 2014). Tumorerkrankungen sind derzeit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2010 starben 118.202 Männer (28,9 %) und 100.867 Frauen (22,4 %) in Deutschland an Krebs (RKI und GEKID 2013). Für das Jahr 2030 wird prognostiziert, dass 13,2 Millionen Menschen weltweit an einer krebsassoziierten Erkrankung sterben (BRAY et al. 2012). Die altersstandardisierte Mortalitätsrate je 100.000 Einwohner für Krebs des Mund- und Rachenbereiches lag im Jahr 2010 für Männer bei 7,2 und für Frauen bei 1,8 Prozent (RKI 2014).

Auch in der Tiermedizin steigt die Relevanz von Krebserkrankungen, vor allem auf Grund der steigenden Rate an Neudiagnosen (CIAPUTA et al. 2013, NOWAK et al. 2010). Diese Entwicklung reflektiert zum Einen die stetig wachsende Zunahme der Erkrankungshäufigkeit selbst, zum Anderen spiegeln sie die Spezialisierungen der Tiermedizin, einhergehend mit besseren und häufiger angewandten diagnostischen

Techniken, und die zunehmende Sensibilität der Besitzer für Erkrankungen an ihren Tieren wieder (NOWAK et al. 2010). Die Ursachen hierfür sind multifaktoriell (MISDORP et al. 2013). So ist beispielsweise die Lebenserwartung der Haustiere mit den guten Lebensbedingungen und den tierärztlichen Möglichkeiten gestiegen, was zu einem vermehrten Auftreten von altersbedingten Erkrankungen führt. Die Häufigkeit von Tumorerkrankung reflektiert somit zumindest teilweise das zunehmende Durchschnittsalter von Katzen- und Hundepopulationen (COOLEY et al. 2003, LORD et al. 2007). Die höchste Tumorzinzidenz für Hunde liegt zwischen dem 9. und 11. Lebensjahr (VASCELLARI et al. 2009). Bei Katzen wird am häufigsten zwischen dem siebten und elften Lebensjahr ein Tumor diagnostiziert (CIAPUTA et al. 2013). Beim Hund ist Krebs die häufigste krankheitsbedingte Todesursache (THORPE-VAGAS 2013). BONETT et al. (2005) ermittelten, dass 18 % der Hunde, bei welchen eine Todesursache eruiert werden konnte, infolge eines Krebsleidens verstarben. Nahezu 50 % der Hunde über 10 Jahre sterben durch eine krebsassoziierte Erkrankung (KASER-HOTZ et al. 1994).

Die Tumorzinzidenz bei Hunden und Katzen ist von der Rasse abhängig. In Schweden sind Berner Sennenhund, Irischer Wolfshund, Flat-coated Retriever, Boxer und Bernhardiner die Hunderassen mit der höchsten Mortalitätsrate infolge einer Krebserkrankung (BONNETT et al. 2005). PROSCHOWSKY et al. (2003) untersuchten die dänische Hundepopulation und fanden für die Rassen Berner Sennenhund, Flat-coated und Golden Retriever und Rottweiler eine 20 %ige Todesrate infolge von Krebs. Hingegen ist die Tumorzinzidenz beim Dackel und beim Cavalier King Charles Spaniel gering (BONNETT et al. 2005). Ebenso gibt es auch Katzen-Rassen, die für Tumorerkrankungen prädisponiert sind. Allgemein gilt, dass Rassekatzen häufiger erkranken als Mischlingskatzen (VASCELLARI et al. 2009).

Die Inzidenz für die Diagnose oraler Tumoren bei Hunden und Katzen lag in den siebziger Jahren des 20. Jahrhundert bei 70,4 bzw. 45,4 pro 100.000 Tiere (DORN und PRIESTER 1976). CIAPUTA et al. (2013) fanden 85,2 % aller gastrointestinalen Tumoren des Hundes in der Maulhöhle. Dies entspricht früheren Untersuchungen (NOWAK et al. 2010).

Die bedeutendsten malignen Tumoren der Maulhöhle beim Hund sind Melanom, Plattenepithelkarzinom, Fibrosarkom und Osteosarkom (KESSLER 2013). Extramedulläre Plasmozytome gewinnen zunehmend an Bedeutung (WRIGHT et al. 2008). In einer Auswertung von 491 Biopsaten oraler Tumoren beim Hund waren 44 % gutartig und 56 % bösartig, wobei das maligne Melanom am häufigsten nachzuweisen war (KESSLER 2005b). Das Plattenepithelkarzinom ist der zweithäufigste und das Fibrosarkom der dritthäufigste maligne orale Tumor beim Hund (LIPTAK und WITHROW 2007, HOYT und WITHROW 1984). Bei der Katze ist das Verdauungssystem die zweithäufigste Lokalisation für Neoplasien. Mehr als 3/4 der Tumoren sind

in der Maulhöhle lokalisiert (NOWAK et al. 2010, CIAPUTA et al. 2013). Hiervon sind fibröse Epuliden 25-50 %, nichtkeratinisierende Plattenepithelkarzinome 25 % und Fibrosarkome  $\leq 10$  %. Für andere Tierarten liegen keine verlässlichen Daten vor (CIAPUTA et al. 2013, NOWAK et al. 2010).

Die Diagnose einer Tumorerkrankung beim Haustier ist für viele Tierbesitzer keine Indikation mehr zur Euthanasie der Patienten (NORTH und BANKS 2009a, ROHRER BLEY 2007). Die enge Bindung zwischen Mensch und Tier führt zu einem zunehmenden Wunsch nach adäquater tierärztlicher Behandlung, anlehnend an die humanmedizinischen Möglichkeiten (ROHRER BLEY 2007). Die Entwicklung in der Veterinärmedizin hat dabei von den Fortschritten in der humanmedizinischen Onkologie profitiert (LUDEWIG et al. 2010). In onkologischen Fachkliniken steht für die Behandlung von Tieren durch ausgebildete Onkologen ein der Humanmedizin entsprechendes Spektrum an Therapieoptionen zur Verfügung. Aus ethischen Gründen (Schwierigkeiten, das posttherapeutische Wohlbefinden des Patienten abzuschätzen; Möglichkeit zur Euthanasie und damit eine Option unnötiges Leid zu verhindern) werden in der Tumorthherapie von Tieren weniger Nebenwirkungen toleriert als in der Humanmedizin.

Ziel einer sinnvollen Krebsbehandlung ist es, eine gute Lebensqualität des Tieres zu erhalten bzw. zu erreichen, während und auch nach der Behandlung. Die kurative Therapie zielt auf eine Heilung oder langfristige Tumorkontrolle ab. Mitunter sind diese Behandlungsprotokolle mit Nebenwirkungen und einer gewissen Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten verbunden. Eine palliative Therapie (Linderung der durch die Krebserkrankung hervorgerufenen Symptome) ist bei älteren Tieren das häufigere Therapieziel, v.a. wenn die physiologische Lebenserwartung unter der mittleren Überlebenszeit in Folge der Neoplasie (Zeitraum von Diagnosestellung bis Tod) liegt. Ziel ist es, das Tumorgeschehen zu stabilisieren, Schmerzen zu lindern und Funktionen wieder herzustellen. Auch wenn dadurch die Lebenszeit indirekt verlängert wird, soll primär die Lebensqualität verbessert werden.

In der Tumorbehandlung muss die geeignete Therapieoption bzw. geeignete Kombination individuell ausgewählt werden. Neben der Art der Neoplasie, dem Erkrankungsstatus und dem Gesundheitsstatus des Patienten spielt in der Tiermedizin die Bereitschaft der Besitzer zur Behandlung eine entscheidende Rolle.

## 2.2 Multimodale Tumorbehandlung

Die Tumorthherapie hat drei Grundsäulen: Tumorchirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie. Welche Therapiemodalität zum Einsatz kommt, ist u.a. von der Art, dem Wachstumsverhalten und der Lokalisation des Tumors abhängig.

Die alleinige **Chirurgie** ist in der Tiermedizin die am weitesten verbreitete Behandlungsoption. Sie eignet sich für lokal abgegrenzte Neoplasien ohne Metastasierungsneigung mit nichtinfiltrativem Wachstum, bei welchen es möglich ist, bei der

Operation einen Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe einzuhalten. Eine rechtzeitige chirurgische Intervention ist das wirksamste Mittel der Krebstherapie und ist häufig die einzige Behandlungsmodalität, die eine Heilung der Patienten herbeiführen kann (KESSLER 2005a). **Chirurgie kombiniert mit Chemotherapie** ist in der Tiermedizin etabliert und gut verfügbar (CRUMP und THAMM 2011). Okkulte Metastasen oder infiltrativ wachsende Neoplasien wie das canine Osteo- oder Hämangiosarkom werden durch eine adjuvante Chemotherapie nach chirurgischer Zytoreduktion des Primärtumors am Besten erreicht (NORTH und BANKS 2009c, CHUN et al. 2007). Eine alleinige **Chemotherapie** ist dagegen nur bei chemosensitiven Tumoren wie Lymphomen, Myelomen und transmissiblen veneralen Tumoren angezeigt (CHUN et al. 2007).

Tumoren, deren Behandlung für gewöhnlich eine Indikation zur **Radiotherapie** bei Hund und Katze stellen, sind: Tumoren der Haut, nasale und orale Neoplasien, Lymphome, Hirntumoren und Osteosarkome (KASER-HOTZ 2013, BUCHHOLZ 2010). Unter Berücksichtigung des onkologischen Gesamtkonzeptes findet die Radiotherapie entweder als Monotherapie oder **in Kombination mit Chirurgie** und/oder **Chemotherapie** statt. Die Kombination von Strahlentherapie und Chemotherapie wird in der Tiermedizin für die Therapie von Analbeutelkarzinomen mit Metastasierung in die regionalen Lymphknoten, Nasentumoren, Blasentumoren, oralen und tonsillären Plattenepithelkarzinomen eingesetzt (CHUN et al. 2007).

## 2.3 Strahlentherapie und Behandlungsprotokolle in der Tiermedizin

In der Humanmedizin ist die Strahlentherapie nach der Chirurgie die zweitwichtigste Behandlungsform für Malignome (KASER-HOTZ 2005). Grundsätzlich gelten für die Tiermedizin die gleichen Behandlungsstrategien wie für den Menschen. Während in der Humanmedizin kurative Protokolle bei täglicher Bestrahlung 6 bis 7 Wochen dauern, sind solche Behandlungsschemata in der Veterinärmedizin jedoch kaum durchzuführen (KASER-HOTZ 2005). Tiere müssen für beinahe jede strahlentherapeutische Behandlung per Narkose immobilisiert werden, um die optimale Positionierung zu gewährleisten. Aus diesem Grund besteht immer ein Kompromiss zwischen der Anzahl an applizierbaren Fraktionen, um u.a. das Risiko strahlenbedingter Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten, und der Anzahl an vertretbaren Narkosen.

Die zu applizierende Gesamtdosis wird bei **konventioneller/normofraktionierter Strahlentherapie** einmal täglich an 5 aufeinander folgenden Tagen/Woche appliziert. In **hyperfraktionierten Protokollen** wird 2-3mal täglich ( $\geq 5$  Fraktionen/Woche) bestrahlt. Aufgrund der häufigen hierfür nötigen Narkosen finden hyperfraktionierte Protokolle in der Tiermedizin keine Anwendung. **Hypofraktio-**

**nierte Protokolle** mit höheren Einzeldosen (einmal täglich) und in der Regel kürzeren Gesamtbehandlungszeiten sind in der Tiermedizin üblich (FOALE und DEMETRIOU 2010).

### 2.3.1 Bestrahlungsarten

#### 2.3.1.1 Externe Bestrahlung

Bei der externen Strahlentherapie (Teletherapie) befindet sich die Quelle der Strahlung außerhalb des Körpers. Abhängig von dem zu bestrahlendem Gebiet können für oberflächliche Neoplasien Orthovolt-Röntgen-Röhren verwendet werden. Sie arbeiten in Energiebereichen von 50-350 kV. Allerdings ist durch die relativ geringe Eindringtiefe der Einsatz limitiert.  $^{60}\text{Cobalt-}\gamma$ -Strahlung hat Energien mit 1,17 MeV bis 1,33 MeV. Megavolt-Linearbeschleuniger (1,2 bis  $\geq 20$  MeV) erlauben ebenfalls die Bestrahlung von tiefliegenden Tumoren (KASER-HOTZ und BUCHHOLZ 2013).

#### 2.3.1.2 Brachytherapie

Bei der Brachytherapie (Kontakttherapie) werden Tumoren mit Hilfe einer radioaktiven Strahlenquelle aus kurzer Distanz bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgt durch Seed-Implantation oder durch Afterloading. Bei der Seed-Implantation werden Strahlenquellen (umschlossene Radioisotope, z.B.  $^{103}\text{Pd}$  oder  $^{125}\text{I}$ ) mittels Ultraschallkontrolle auf oder in das Zielgebiet eingebracht. Hierbei unterscheidet man zwischen der Oberflächentherapie, der intrakavitären Brachytherapie, bei welcher die Strahlenquelle in Hohlorgane eingeführt wird, und der interstitiellen Brachytherapie, bei der Strahlenquellen (Seeds) direkt in den Tumor implantiert werden. Seed haben eine "Low-Dose-Rate". Beim Afterloading wird das zu bestrahlende Gewebe zunächst mit nicht-strahlenden Führungen gespickt, welche dort für die Dauer der Therapie verbleiben. Anschließend werden die Führungen an ein Gerät angeschlossen, aus welchen über die Führungsschienen/-schläuche die Strahlenquellen definiert in das Zielgebiet eingefahren werden.

Die Brachytherapie hat sich in der Veterinärmedizin wenig durchgesetzt (KASER-HOTZ und BUCHHOLZ 2013). Vielversprechende Therapieansätze gibt es bereits bei caninen Mastzelltumoren der Haut (NORTHROP et al. 2004), dem Equinen Sarkoid (BYAM-COOK et al. 2006) und tiefliegenden Hirntumoren (PACKER et al. 2011). Auch die Therapie von intranasalen Tumoren kann mittels der Brachytherapie durchgeführt werden (WHITE et al. 1990, THOMPSON et al. 1992).

Eine Sonderform der Teletherapie stellt die intraoperative Radiotherapie dar. Sie repräsentiert eine kleinvolumige Dosisaufsättigung und wird gewöhnlich mit einer perkutanen Radiotherapie kombiniert (ROEDER et al. 2011). Die Kombination mit chirurgischer Tumorsektion und Chemotherapie ist möglich (WILLETT et al. 2007). Je nach Resektionsstatus werden Dosierungen von 10 bis 20 Gy empfohlen (ROEDER et al. 2011). HENSCHKE und HENSCHKE (1944) schonten das umliegende Gewebe, indem es zurückgezogen oder abgeschirmt wurde. Diese Methodik ist



auch in der modernen Strahlentherapie noch üblich.

Die intraoperative Bestrahlung der langen Röhrenknochen beim Hund mit Sarkomen mit einer einzelnen Dosis (70 Gy), führte zu kontroversen Ergebnissen (BOSTON et al. 2007, LIPTAK et al. 2004).

### 2.3.1.3 Nuklearmedizinische Therapie

In der Radionuklidtherapie werden offene radioaktive Stoffe (Radiotherapeutika) lokal oder systemisch verabreicht. Eine Anwendungsmöglichkeit ist die Behandlung der Hyperthyreose bei Katzen mit Jod-131 (Radiojodtherapie). AAS et al. (1999) nutzten  $^{153}\text{Samarium-EDTMP}$  (Ethylen-diamino-tetramethyl-phosphat) um Osteosarkome bei Hunden zu therapieren, wobei sie nach einmaliger Injektion eine mittlere Tumordosis von ca. 20 Gy erreichten. Bei degenerativen Gelenksveränderungen kann mittels Radiosynoviorthese (RSO) eine Schmerzreduktion erreicht werden. Beta-Strahler werden direkt in das betroffene Gelenk appliziert und von der Synovialmembran phagozytiert. Durch die intraartikuläre Bestrahlung der entzündeten Synovialis werden hypertrophierte oberflächliche Schichten zerstört (NEUBERGER 2005). FRANKE und MEYER (2010) erreichten mit Rhenium-186-Sulfid nach bereits 4 Wochen bei 39 % der Hunde eine Verbesserung der Lahmheit um mindestens eine Lahmheitsstufe. Im weiteren Verlauf konnten bei 43 % der Hunde eine Verbesserung festgestellt werden. Keiner der Hunde zeigte nach dem Eingriff eine Verschlechterung der Symptome. In der Pferdemedizin werden seit vielen Jahren Gelenkserkrankungen, die resistent gegenüber herkömmlichen Schmerzmedikamenten, Kortison und anderen Therapien sind, mit RSO behandelt.

## 2.3.2 Bedeutung

Bereits 1937 veröffentlichten Pommer und Mahling Beobachtungen zu Strahleneffekten an der Haut von Hunden (POMMER und MAHLING 1937). Schnell wurde das Potenzial der ionisierenden Strahlung für die Behandlung von Tumoren erkannt. Seit dieser Zeit hat sich die radiologische Onkologie in der Veterinärmedizin in Analogie zur Humanmedizin zu einer präzisen Disziplin entwickelt. Die Kompetenz auf dem Gebiet der veterinärmedizinischen Onkologie hat mittlerweile eine hohe Qualität erreicht (LUDEWIG et al. 2010). Vor allem in den USA haben sich viele radioonkologische Zentren etabliert. Im Jahr 2001 gab es bereits 42 Kliniken (MC ENTEE 2004). Im Jahr 2014 sind über 76 Spezialkliniken auf der Homepage der *“Veterinary Cancer Society“* angegeben (VCS 2014). In Europa fand diese Entwicklung bedeutend langsamer statt und es fehlt eine zentrale Auflistung der Therapiezentren, sodass sich die Daten wesentlich unterscheiden. Auf der Homepage der *“Veterinary Society of Surgical Oncology“* sind 8 Tierkliniken als strahlentherapeutische Einrichtung in ganz Europa gelistet (VSSO 2014). Die *“PETCANCERCENTER.org“* listet 10 onkologische Spezialeinrichtungen im Vereinigten Königreich, 3 in Deutschland und 8

weitere für Resteuropa [Österreich (1), Frankreich (2), Italien (2), Niederlande (1), Schweden (1), Schweiz (1)] (PETCANCERCENTER.org 2014).

### 2.3.3 Kurative Bestrahlungsprotokolle in der Tiermedizin

Intention der kurativen Bestrahlung ist die lokale Kontrolle der Tumorerkrankung. Diese Protokolle können sowohl als alleinige Therapie, als auch nach chirurgischer Resektion erfolgen, wenn die Gefahr besteht, dass einzelne Tumorzellen zurückgeblieben sind (postoperative/adjuvante Radiotherapie).

Die Radiotherapie als alleinige Behandlungsstrategie kommt häufig bei sehr radiosensitiven oder chirurgisch unzugänglichen Neoplasien zum Einsatz (ELLIOT und MAYER 2009). KASER-HOTZ und BUCHHOLZ (2013) schlagen ein kuratives Protokoll von 14-20 Fraktionen mit einer Einzeldosis von 2,5 - 3,5 Gy (Hypofraktionierung) vor, wobei die Bestrahlung i.d.R. in 5 Fraktionen pro Woche stattfindet. In einigen Therapiezentren findet die Bestrahlung aber auch an nur drei Tagen in der Woche in einem Montag-Mittwoch-Freitag-Schema statt (KASER-HOTZ 2005). In den USA wird häufig ähnlich der Humanmedizin von Montag-Freitag bestrahlt, wobei 18-21 Fraktionen über einen Zeitraum von 3-4 Wochen appliziert werden (FOALE und DEMETRIOU 2010). In Großbritannien sind hypofraktionierte Protokolle mit 4-5 Fraktionen, einmal pro Woche verbreitet, wobei auch hier aufgrund der Nebenwirkungen der Trend hin zu normofraktionierten Protokollen geht (FOALE und DEMETRIOU 2010). Vom strahlenbiologischen Standpunkt her sind Protokolle mit einer täglichen Strahlenbehandlung besser (KASER-HOTZ 2005): Vor allem in spät reagierenden Normalgewebe erholen sich die Zellen von subletalen Strahleneffekten zwischen den einzelnen Fraktionen, wenn die Dosis pro Fraktion geringer ist.

### 2.3.4 Palliative Bestrahlungsprotokolle

Palliative Bestrahlungen haben zum Ziel, das Tumorgeschehen zu stabilisieren, Schmerzen zu lindern und Funktionen wieder herzustellen (KASER-HOTZ und BUCHHOLZ 2013). Die Lebensverlängerung wird nicht als Therapieziel definiert, aber häufig wird durch eine bessere Lebensqualität die Lebensdauer (bis zur Euthanasie) indirekt verlängert. Palliative Bestrahlungsprotokolle sind weit flexibler als kurative, und richten sich nach dem individuellen Wohlbefinden des Tieres. Es sollen keine oder nur minimale Nebenwirkungen auftreten (KASER-HOTZ 2005). Die Belastungen durch die Therapie sollen nicht größer sein, als durch die Erkrankung an sich. Palliativprotokolle bestehen i.d.R. aus 2-5 Bestrahlungen von je 6-10 Gy, die ein- oder zweimal pro Woche appliziert werden (KASER-HOTZ und BUCHHOLZ 2013). KANDEL (2004) berichtet von 3-6 Fraktionen in unterschiedlichen Abständen für eine palliative Behandlung, wobei die Dosis pro Fraktion nicht genauer erläutert wird. Osteosarkome werden häufig mit einer palliativen Intention bestrahlt, wobei

eine Schmerzreduktion angestrebt wird, welche häufig nach kurzen Zeitintervallen (Stunden bis Wochen) beobachtet wird. Hierbei wurden Protokolle mit 7 bis 10 Gy an Tag 0, 7 und 10 verwendet (MCENTEE et al. 1993). Gesunde Knochenzellen setzten als Reaktion auf den Tumor Prostaglandine frei. Dies wird durch die Bestrahlung unterdrückt und damit die Schmerzzinduktion am Periost reduziert. Später ( $\geq 2$  Wochen) tritt eine Rekalzifizierung osteolytischer Läsionen auf (KANDEL-TSCHIEDERER 2013). MCDONALD et al. (2012) verzeichneten ebenfalls gute Erfolge (mittlere Überlebenszeit von 4,2 Monaten) mit einem Protokoll von 4 Gy an 5 aufeinanderfolgenden Tagen.

Eine palliative Radiotherapie wird auch bei anderen Tumorarten mit verschiedensten Behandlungsprotokollen genutzt, wie z.B. beim Schilddrüsenkarzinom (BREARLEY et al. 1999), Plattenepithelkarzinom (BREGAZZI et al. 2001), oralen Melanomen (PROULX et al. 2003) und histiozytären Sarkomen (FIDEL et al. 2006).

### 2.3.5 Strahlentherapie nicht-onkologischer Erkrankungen

Die Effekte ionisierender Strahlung werden auch bei nicht-neoplastischen Erkrankungen genutzt. Die Indikation zur Bestrahlung sind u.a. Schmerzbestrahlung, Entzündungsbestrahlung und chronisch-degenerative Erkrankungen (siehe auch 2.3.1.3).

ARENAS et al. (2006) konnten bei experimentellen Untersuchungen durch geringe Bestrahlungsdosen (0,1-0,6 Gy) antiinflammatorische Effekte nachweisen. Der beste antiinflammatorischen Effekt wurde bei einer einmaligen Bestrahlung mit 0,3 Gy erzielt.

Beim Menschen und beim Tier werden schmerzhaft arthrotische Knochen- und Gelenkserkrankungen durch Bestrahlung therapiert (KANDEL 2004, RUPPERT et al. 2004). Bestrahlungen zur Schmerztherapie haben keine Nebenwirkungen, da wenige Fraktionen und geringe Gesamtdosen genügen (KASER-HOTZ und BUCHHOLZ 2013). Arthrotisch-degenerative Knochen- und Gelenkserkrankungen konnten in einer Untersuchung in ca. 80 Prozent der Fälle günstig beeinflusst werden (HARTUNG 1980). RUPPERT et al. (2004) verzeichneten bei 63 % der bis dahin therapieresistenten Patienten eine Besserung.

### 2.3.6 Tumoren der Maulhöhle beim Hund

Ca. 6 % aller Tumoren des Hundes sind Tumoren der Mundhöhle (LIPTAK und WITHROW 2007, HOYT und WITHROW 1984). Die bedeutendsten malignen Tumoren der Maulhöhle beim Hund sind Melanom, Plattenepithelkarzinom, Fibrosarkom und mit zunehmender Bedeutung extramedulläre Plasmozytome (KESSLER 2013, KESSLER 2005b, WRIGHT et al. 2008). Die Strahlentherapie, welche entweder primär oder in Kombinationsprotokollen durchgeführt wird, führt in diesem anatomisch schwer zugänglichem Einsatzgebiet zu einer guten lokalen Tumorkontrolle.

Eine Übersicht zu unterschiedlichen Behandlungsstrategien oraler Tumoren beim

Hund ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Strahlentherapie caniner Tumoren der Maulhöhle

Tumor	n	Gesamt-dosis[Gy]	Fraktionen	adjuvante Therapie	Ergebnis	Quelle
Melanom	38	36	4	–	66 %: CR, 24 %: PR, 10 %: LR	BLACKWOOD und DOBSON (1996)
	13	36	4	–	MÜZ 307 d	MURPHY et al. (2005)
	15	36	4	ChT (CPT)	MÜZ: 286 d	MURPHY et al. (2005)
	54	36	4	ChT (CPT,	MT: 5 M	PROULX et al. (2003)
	69	30	3	Me, DDP)		
	17	>45	12-19	S		
nicht-tonsilläres PEK	14	93 %: 48; 7 %: 57	57 %: 12; 35 %: 12; 8 %: 19 (MWF/M-F)	k.A., Multimod	MT: 365d, MÜZ: 450d	LADUE-MILLER et al. (1996)
	1	60	15 (MWF)	ChT: (CPT&Dox)	MT: 421d	MESTRINHO et al. (2012)
	9	<38,5	10	–	MT:	EVANS und SHOFER (1988)
	24	>38,5	(MWF)		1,8-12M	
tonsilläres PEK	24	palliative RT: 24-30	3-5	S, ChT	MÜZ: 4M-2J	KESSLER und KÜHNEL (2011)
	8	35-42	10 (MWF)	S	MÜZ: 110d	MAC MILLAN et al. 1982
FSA	7	42-57	10-19 (M-F)	S	MÜZ: ≥914d	FORREST et al. 2000
FSA extraoral	9	51	17 (M-F)	S, ChT (Dox)	MÜZ: 910d; Rezidive: 213d; Metastasen: 276d	SIMON et al. 2007
	14	63	21 (MWF)	S	MÜZ: 902d	MC KNIGHT et al. 2000
axiales OS	12	20-30	2-3	k.A., Multimod	MÜZ:79d	DICKERSON et al. 2001

	8	45-57	MWF / M-F	k.A., Multimod	MÜZ: 265d	DICKERSON et al. 2001
Epulis	57	40-48	MWF	S	MÜZ: 1441d; MT:1210d	MC ENTEE et al. 2004

**M-F:** Bestrahlung Montag-Freitag **MWF:** Montag-Mittwoch-Freitag-Schema **d:** Tage **Wo:** Wochen **M:** Monate **J:** Jahre **bid:** 2mal täglich **biw:** 2mal wöchentlich **MT:** mittlere Zeitspanne bis zum Auftreten des 1. Ereignisses **MST:** mittlere Überlebenszeit **CR:** komplette Remission **PR:** partielle Remission **LR:** Lokalrezidiv **k.A.:** keine Angaben **S:** Chirurgie **ChT:** Chemotherapie **RT:** Radiotherapie **OS:** Osteosarkom **FSA:** Fibrosarkom **PEK:** Plattenepithelkarzinom **n:** Anzahl der Probanden **CPT:** Carboplatin **DDP:** Cisplatin **Me:** Melphalan **Dox:** Doxorubicin **Multimod:** Multimodale Therapie

Gute Ergebnisse können vor allem durch die Anwendung hoher Einzeldosen (Hypofraktionierung) bei **Melanomen** erzielt werden (KESSLER 2005b). PROULX et al. (2003) verglichen bei 140 Hunden mit oralen Melanomen verschiedene Bestrahlungsprotokolle in Kombinationstherapien (60 % Chirurgie und 57 % systemische Chemotherapie) miteinander. Die durchgeführten Bestrahlungsprotokolle waren bei 39 %  $4 \times 9$  Gy, bei 49 %  $3 \times 10$  Gy und bei 12 %  $\geq 45$  Gy ( $2-4$  Gy  $\times$  12-19 Fraktionen). Weder das Bestrahlungsprotokoll noch die Chemotherapie hatten Einfluss auf mittlere Überlebenszeit (7 Monate) oder Rezidivrate. Eine Abhängigkeit der mittleren Überlebenszeit von Risikofaktoren (Tumorzusatz, Knochenlyse und Melaninart) konnte nachgewiesen werden. Hunde ohne Risikofaktor hatten mittlere Überlebenszeiten von 21 Monaten, mit einem Risikofaktor von 11 Monaten, mit 2 Risikofaktoren von 5 Monaten und mit 3 Risikofaktoren von 3 Monaten. In aktuellen Untersuchungen wurde eine DNS-Tumor-Vakzine in Verbindung mit Strahlentherapie ( $4 \times 8$  Gy einmal wöchentlich) getestet und mittlere Überlebenszeiten von 5,8 Monaten erreicht (HERZOG et al. 2013). Jedoch wird in der Literatur auch von Überlebenszeiten von 2 Jahren bereits mit Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose berichtet (HAHN et al. 1994).

Das **Plattenepithelkarzinom (PEK)** ist ein weiteres häufiges orales Malignom bei Hunden (BRONDEN et al. 2009, HOYT und WITHROW 1984). Es wird je nach Lokalisation zwischen gingivalen (einschließlich Gaumen, labialer und bukkaler Mukosa), lingualen und tonsillären PEK unterschieden. Die Prognose ist deutlich von der Primärlokalisation und dem damit verbundenem biologischem Verhalten abhängig. Tonsilläre (kaudale) Formen metastasieren häufiger als gingivale PEK und haben eine schlechtere Prognose (KESSLER 2013, KESSLER 2005b, EVANS und SHOFR 1988). Aus diesem Grund scheint die Einteilung in tonsilläre und nicht-tonsilläre PEK sinnvoll. Die Mehrzahl (50-78 %) der oralen PEK sind *nicht-tonsillären* Ursprungs (BROOKS et al. 1998). Wie von GRIER und MAYER (2007)

dargestellt, ist es äußerst schwierig, Studien zu nicht-tonsillären PEK miteinander zu vergleichen. Ob darüber hinaus auch Patienten mit kaudal gelegenen gingivalen Tumoren eine signifikant kürzere Überlebenszeit haben, ist umstritten (KESSLER 2013). KESSLER und KÜHNEL (2011) fanden mediane Überlebenszeiten von 32,5 Monaten bei gingivalen Plattenepithelkarzinomen. Die mediane Überlebenszeit ist ohne Lymphknotenmetastasen mehr als doppelt so lang (45 Monate), als mit bereits nachgewiesener Metastasierung (20 Monate).

**Sarkome** sind Tumoren mesenchymalen Ursprungs. Zu den oralen Sarkomen zählen Osteosarkome der Kieferknochen und Fibrosarkome. Sie sind die dritthäufigsten, malignen Maulhöhlentumoren beim Hund, wobei Fibrosarkome häufiger als Osteosarkome auftreten (KESSLER 2005b). **Fibrosarkome (FSA)** sind in ihrem biologischen Verhalten sehr invasiv und metastasieren z.T. im tributärem Gebiet und in die Lymphknoten. Jedoch ist die Metastasierungsrate oraler Fibrosarkome niedriger als die der übrigen Neoplasien der Maulhöhle (KESSLER 2013, KESSLER 2005b). CIEKOT et al. (1994) fanden bei 8 von 25 Hunden Metastasen in der Lunge oder den regionären Lymphknoten. Die frühzeitige radikale Operation (Mandibulektomie bzw. Maxillektomie) gilt als Therapie der Wahl (GOLDSCHMIDT und HENDRICK 2002, NORTH und BANKS 2009d, KESSLER 2005b). Fibrosarkome sind wenig radiosensitiv und sprechen auch schlecht auf Chemotherapie an (THRALL 1981). Eine adjuvante Radiotherapie kann v.a. bei unvollständiger chirurgischer Resektion vorteilhaft sein (GOLDSCHMIDT und HENDRICK 2002). Megavolt-Bestrahlung von mikroskopisch nachweisbaren Tumorresten führt zu medianen Überlebenszeiten von 1572 Tagen (GAMER 2004). **Osteosarkome (OS)** stellen 11,5 % der caninen oralen Tumoren dar (WALLACE et al. 1992). Vor allem kleine und mittlere Rassen scheinen eine Prädisposition zu Osteosarkomen im Bereich der Kieferknochen zu haben, wobei die Mandibula häufiger betroffen ist (NAGEL 2005).

**Epuliden** sind bei Hunden die häufigste benigne Neoplasie und machen ca. 30 % aller Maulhöhlentumoren des Hundes aus (KESSLER 2005b). Man unterscheidet zwischen den peripheren odontogenen Fibrom und dem peripheren (acanthomatösen) Ameloblastom (Epulis acanthomatosa) (FIANI et al. 2011, GARDNER 1996). Boxer sind für die peripheren odontogenen Fibrome (Epulis fibromatosa und ossificans) prädisponiert (KESSLER 2005b). Das biologische Verhalten ist gutartig, jedoch können Rezidive bei zu oberflächlicher Resektion auftreten. Hingegen neigen acanthomatöse Epuliden zu schnellem Wachstum mit Invasion und Destruktion des Kieferknochens (KESSLER 2005b). Sie gehören zu den strahlensensitiven Tumoren. THRALL (1981) konnten bei 27 von 39 Hunden eine komplette Remission durch Orthovolt-Bestrahlung erreichen. Bei nur 3 Hunden kam es nach der Bestrahlung zu einem erneutem Wachstum. In einer retrospektiven Studie mit 57 Hunden konnte nach einer Radiotherapie mit Gesamtdosen von 40-48 Gy (Montag-Mittwoch-

Freitag-Schema) eine mediane Überlebenszeit von 1441 Tagen erreicht werden. Die mittlere Zeitspanne bis zum Auftreten des ersten Ereignisses betrug 1210 Tage (MC ENTEE et al. 2004).

### 2.3.7 Tumoren der Mundhöhle bei der Katze

Ungefähr 10 % der feline Tumoren kommen in der Maulhöhle vor, davon sind ca. 90 % maligne (STEBBINS et al. 1989). Meist sind diese gingivalen Ursprungs oder auf der Zunge lokalisiert.

Eine Übersicht zu der Radiotherapie als alleinige oder adjuvante Tumorenbehandlung gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Strahlentherapie feliner Tumoren der Maulhöhle

Tumor	n	Gesamtdosis[Gy]	Fraktionen	adjuvante Therapie	Ergebnis	Quelle
PEK	31	49	14	S ChT:CPT 90- 100mg/m <sup>2</sup>	MÜZ: 163d	FIDEL et al. (2011)
	9	49	14	–	MÜZ: 86d	FIDEL et al. (2007)
	8	36	6Gy biw	ChT: Gemcitabine (RS)	MÜZ: 111,5d	JONES et al. (2003)
	7	k.A.	k.A.	S	MÜZ: 14 M	HUTSON et al. (1992)

**M-F:** Bestrahlung Montag-Freitag **MWF:** Montag-Mittwoch-Freitag-Schema **d:** Tage **M:** Monate **biw:** 2mal wöchentlich **MÜZ:** mittlere Überlebenszeit **k.A.:** keine Angaben **S:** Chirurgie **ChT:** Chemotherapie **PEK:** Plattenepithelkarzinom **n:** Anzahl der Probanden **CPT:** Carboplatin **RS:** Radiosensitizer

Das **Plattenepithelkarzinom (PEK)** der Katze zählt mit ca. 60-80 % aller oralen Tumoren zu der häufigsten Neoplasie der Mundhöhle (MOORE 2009, STEBBINS et al. 1989). Es werden 3 Hauptlokalisationen unterschieden: gingivale, sub-/linguale und tonsilläre PEK. Häufig ist der Tumor bei Diagnose schon in den Kieferknochen eingewachsen. Ein radikales chirurgisches Vorgehen mit kurativer Intention wird von Katzen jedoch weniger gut toleriert als beim Hund; zudem treten häufig innerhalb kurzer Zeit Rezidive auf (KESSLER 2013, NORTHRUP et al. 2006). Gelegentlich kommen Metastasen in den regionären Lymphknoten vor, Lungen- und andere Organmetastasen sind selten. Eine alleinige Strahlentherapie mit einem akzelerierten Protokoll (14 Fraktionen·3,5 Gy in 9 Tagen, mit zweimaliger Bestrahlung/Tag) führt

zu medianen Überlebenszeiten von  $86 \pm 110$  Tagen (FIDEL et al. 2007). Chemotherapie und Kieferresektion führen in Verbindung mit Bestrahlung zu mittleren Überlebenszeiten von 163 Tagen (FIDEL et al. 2011).

**Fibrosarkome (FSA)** sind die zweithäufigsten oralen Tumoren der Katze (13-18 %) (COTTER 1989, STEBBINS et al. 1989). Meist sind sie im Bereich der Gingiva, aber auch am harten und weichen Gaumen lokalisiert (STEBBINS et al. 1989). Die chirurgische Resektion ist bei dieser Tumorart das Mittel der Wahl, da FSA als radioresistent gelten (NORTH und BANKS 2009d). Empfehlungen zur Chemotherapie oder Bestrahlung oraler Fibrosarkome liegen z.Z. nicht vor (KESSLER 2013).

**Osteosarkome (OS)** betreffen bei der Katze häufiger den Ober- als den Unterkiefer (NAGEL 2005). Für Osteosarkome wird eine radikale Therapie (partielle Mandibulektomie bzw. Maxillektomie) empfohlen. Jedoch wird die partielle oder vollständige Kieferresektion von Katzen schlecht toleriert und eine lebenslange Zwangsfütterung ist notwendig.

**Melanome** und **Epuliden** kommen bei der Katze verhältnismäßig selten vor (KESSLER 2013).

## 2.4 Nebenwirkungen der Strahlentherapie

Eine Strahlentherapie mit kurativer Intention ist immer mit einem gewissen Risiko für Nebenwirkungen verbunden. Trotz sorgfältiger Planung und Applikation kommt es immer zu einer Strahlenexposition von Normalgeweben. Diese liegen im Tumor selbst, innerhalb des Sicherheitssaums um das neoplastische Gewebe oder im Ein- bzw. Austrittsbereich der Strahlung. Komplikationen sind deshalb nicht a priori als Zeichen einer zu aggressiven Therapie anzusehen (DÖRR 2010).

Abhängig von der Zeit zwischen Bestrahlungsbeginn und der Erstdiagnose der Effekte wird zwischen frühen (akuten) und späten (chronischen) Strahlenreaktionen unterschieden. Frühe Strahlenreaktionen sind in der Regel transient, späte Effekte zumeist progredient und irreversibel (DÖRR 2009a).

### 2.4.1 Frühe Strahlenreaktionen

Definitionsgemäß treten frühe Reaktionen erstmalig innerhalb von 90 Tagen nach Bestrahlungsbeginn auf (DÖRR 2010, SEEGENSCHMIEDT und ZIMMERMANN 2000). Früheffekte entwickeln sich in der Regel in Umsatzgeweben, bei denen ein permanenter Zellverlust durch kontinuierliche Zellproliferation kompensiert wird (DÖRR 2006b, DÖRR und HERRMANN 2009). Hierzu zählen beispielsweise die Epithelien der Haut und der Schleimhäute und das Knochenmark. Die Proliferation in diesen Geweben ist hierarchisch organisiert (DÖRR und HERRMANN 2009). Stammzellen führen im ungestörten Zustand asymmetrische Teilungen in eine neue Stammzelle und eine Transitzelle durch. Diese reifen zu postmitotischen Funktionszellen mit einer begrenzten Lebensdauer. Es besteht ein präzise reguliertes Gleich-



gewicht zwischen dem fortwährenden Zellverlust funktionstüchtiger, postmitotischer Zellen und der permanenten Zellproduktion durch Stammzellen in der Germinativschicht (DÖRR 2009a). Die Bestrahlung führt zu einer Beeinträchtigung der Zellproduktion (DÖRR und HERRMANN 2009). Da der physiologische Zellverlust weiter bestehen bleibt, kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelluntergang. Ein progressiver Verlust funktioneller Zellen (Hypoplasie) ist die Folge (DÖRR 2009a, DÖRR et al. 2008, DÖRR et al. 2007). Die klinische Symptomatik früher Strahlenreaktionen tritt mit einer zeitlichen Verzögerung von Tagen bis Wochen nach der Bestrahlung auf, deren Länge von der Umsatzzeit der einzelnen Gewebe bestimmt wird (DÖRR und HERRMANN 2009); die Latenzzeit ist weitestgehend dosisunabhängig. Schweregrad und Dauer früher Strahlenfolgen stehen hingegen in Zusammenhang mit der Anzahl überlebender Stammzellen und sind somit dosisabhängig (DÖRR 2009a).

Frühe Strahlenreaktionen sind in der Regel reversibel. Überlebende Stammzellen im Bestrahlungsgebiet oder eingewanderte teilungsfähige Stammzellen aus den Randgebieten führen zur Regeneration (DÖRR 2009a).

### 2.4.2 Chronische Strahleneffekte

Späteffekte werden nach einer symptomlosen Latenzzeit von Monaten bis zu vielen Jahren nach Beendigung der Radiotherapie beobachtet, verlaufen zumeist progressiv und irreversibel (DÖRR 2009a). Die Latenzzeit ist invers abhängig von der Dosis (HERRMANN et al. 2006a). Die pathologischen Grundlagen chronischer Strahlenfolgen sind komplex, u.a. mit der Beteiligung von Organparenchym, Bindegewebe, versorgenden Gefäßsystem und Immunsystem, wobei die Relevanz der einzelnen Komponenten für verschiedene Gewebe unterschiedlich ist (DÖRR 2009a, HERRMANN et al. 2006a). Die kombinierte Schädigung aller Komponenten führt zu einer Störung der Organfunktion.

### 2.4.3 Konsekutive/späte Strahlenfolgen

Konsekutive Späteffekte stellen aufgrund ihrer Pathogenese eine Sonderform der späten Strahlenfolgen dar. Die Manifestation der chronischen Veränderung wird dabei durch das Ausmaß (Schweregrad und Dauer) der Frühreaktion im gleichen Organ beeinflusst (DÖRR 2009a, DÖRR und HENDRY 2001).

Verschiedene Gewebe haben eine Schutz- bzw. Barrierefunktion gegenüber chemischen, mechanischen und infektiösen Noxen. Durch den Verlust dieser Schutzfunktion der Oberflächenepithelien im Zusammenhang mit der frühen Strahlenreaktion kann es zu einer zusätzlichen Schädigung an den Zielstrukturen für die Spätreaktionen (Gefäße, Bindegewebe) kommen. So können durch Frühreaktionen späte Strahlenfolgen verstärkt werden. Vor allem für Darm, Harnblase, orale Schleimhaut und einige Lokalisationen der Haut, aber auch in der Lunge spielen diese Effekte eine wichtige Rolle (DÖRR 2009a, DÖRR und HENDRY 2001).

#### 2.4.4 Frühe Strahlenreaktionen im Kopf-Hals-Bereich

Frühe Strahlenreaktionen im Kopf-Hals-Bereich beinhalten die Haut und Hautanhangsgebilde (Haare, Augenbrauen, Wimpern), die Speicheldrüsen, Geschmacks- und Geruchsrezeptoren, Augenstrukturen, das Ohr bzw. Gehör und die Mundschleimhaut. Die Mucositis enoralis, als zentrales Thema dieser Arbeit, wird in Kapitel 2.7 gesondert dargestellt.

##### Haut und Anhangsgebilde

Nebenwirkungen der Strahlentherapie betreffen nicht nur die Epidermis, sondern auch Hautanhangsgebilde und tiefere Hautschichten des bestrahlten Areals (DÖRR 2006a). Hautreaktionen verlaufen über Erytheme und Ödembildung, trockene bzw. feuchte Epitheliolyse und in schweren Fällen radiogene Ulzerationen (DÖRR 2006a, MAYER und ANTHONY 2007, ULRICH et al. 2008, NORTH und BANKS 2009b). Der Schweregrad der klinischen Veränderung ist von der applizierten Dosis und der Lokalisation der Reaktion abhängig. Die Haut an Kopf, Nacken und Gesicht ist relativ unempfindlich (DÖRR 2006a).

Frühe Hautreaktionen beginnen bei einem konventionellen Strahlentherapieprotokoll mit  $5 \times 2$  Gy bereits während der 2-3 Woche der Therapie (ULRICH et al. 2008). Die zur Auslösung von Erythem- und ggf. Ödembildung, einer trockenen bzw. feuchten Epitheliolyse notwendigen fraktionierten Bestrahlungsdosen liegen bei etwa 30-40 Gy ( $5 \times 2$  Gy/Woche) (ULRICH et al. 2008). Exsudative Hautreaktionen werden mit Strahlendosen von 50-60 Gy erreicht (DÖRR 2006a).

##### Orale Strahlenreaktionen

**Xerostomie** Die Speicheldrüsen, insbesondere die Parotis (Ohrspeicheldrüse), werden bei der Radiotherapie von Kopf-Hals-Tumoren häufig mitbestrahlt. Durch die Bestrahlung wird das Drüsengewebe, v.a. die serösen Drüsenanteile, zerstört. Schmerzhaftes Entzündungszustände können bereits ab einer Dosis von 10 Gy beobachtet werden, Bestrahlungen mit über 25 Gy führen zum vorübergehenden Versagen des Speichelflusses (HERRMANN et al. 2006a). Zunächst wird eine milde Mundtrockenheit beobachtet (COLLEN und MAYER 2008). Anhaltende Xerostomie mit stark viskösem Speichel kann zu verminderter Nahrungsaufnahme führen (OGAMA und SUZUKI 2012). Die primären funktionellen Konsequenzen sind umso größer, je mehr Drüsengewebe bestrahlt wurde. Durch die radiogene Mundtrockenheit wird zudem die Gefahr von sekundären Infektionen, Zahnkaries und Geschmacksveränderungen erhöht. Im Anschluß an die Therapie können sich die Azinuszellen erholen oder nicht exponierte Speicheldrüsen kompensieren das Defizit. Deshalb sollte die Bestrahlung so geplant werden, dass etwa ein Drittel des Speicheldrüsenvolumens geschont wird. Die Erholung des Drüsengewebes kann Monate bis Jahre dauern (DÖRR 2010).

## Sinnesorgane

**Geschmack** Unter Strahlentherapie werden die Geschmackspapillen direkt zerstört und/oder die sensiblen Nervenfasern geschädigt. Die Geschmacksknospen sind ebenso wie die Mundschleimhaut ein Umsatzgewebe mit einer vergleichbaren Umsatzzeit (DÖRR et al. 2008). Bereits nach einer Gesamtdosis von 20 bis 30 Gy kommt es zum Geschmacksverlust (KAMPRAD et al. 2008, HERRMANN et al. 2006a). Dieser erreicht sein Maximum bei 40 bis 60 Gy Gesamtdosis (KAMPRAD et al. 2008). Die Geschmackswahrnehmung fällt in der Reihenfolge bitter, salzig, sauer und zuletzt süß aus. Es handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen, zu dem auch Mundtrockenheit (Ausbleiben der Spülfunktion) und Beeinträchtigung des Geruchssinnes beitragen. Eine Rückbildung dieser Nebenwirkung kann zwischen 3 und 6 Monaten beobachtet werden, wobei permanente Störungen in den Geschmacksqualitäten zurückbleiben können (RIESENBECK et al. 2013). Ca. ein Drittel der humanmedizinischen Patienten berichten bis zu 2 Jahre nach der Strahlentherapie von partiellen Geschmacksverlust (DÖRR et al. 2008).

**Auge** Liegen Augenstrukturen im Bestrahlungsfeld, so muss auch hier mit frühen Nebenwirkungen gerechnet werden. Dies sind Blepharitis, Blepharospasmen, Konjunktivitis und Keratokonjunktivitis sicca (LARUE und GILLETTE 2007). Die Radiokeratokonjunktivitis (Blepharitis) bildet sich nach Bestrahlungsende wieder zurück (HERRMANN et al. 2006a).

**Ohr** Die seröse Entzündung (Otitis media) ist die wichtigste frühe Strahlenreaktion am Ohr, welche durch Störung der Luft-Schallleitung zu zunehmenden Höreinschränkungen führt. Sie heilt nach Ende der Therapie meist spontan ab. Werden Dosen über 30 Gy erreicht, so werden Strukturen des Innenohrs direkt geschädigt, was zu bleibenden Hörstörungen führen kann (DÖRR 2009a, HERRMANN et al. 2006a). Diese Hörstörungen manifestieren sich zunächst nur bei höheren Frequenzen, mit zunehmender Dosis sind auch tiefe Frequenzen mitbetroffen.

**Geruch** Die Beeinträchtigung des Geruchssinnes erfolgt primär über eine Belüftungsstörung als Folge der radiogenen Mukositis im nasalen Bereich (HERRMANN et al. 2006a). Bereits unter der Strahlentherapie tritt eine Beeinträchtigung zur Geruchsdiskrimination ein; Geruchserkennung und Geruchsschwellen sind dagegen nicht betroffen (HÖLSCHER et al. 2005).

### 2.4.5 Späte Strahlenreaktionen im Kopf-Hals-Bereich

#### Haut und Anhangsgebilde

Nach kompletter klinischer Heilung früher Hautreaktionen können an der Haut chronische Veränderungen auftreten. Hypo- und Hyperpigmentation sind möglich. Des

Weiteren ist ein temporärer oder dauerhafter Haarverlust im Bestrahlungsgebiet wahrscheinlich (DÖRR 2006a). Nachwachsende Haare ändern in der Regel ihre Farbe, so dass Leukotrichie bei dunklem Haarkleid zu erwarten ist und umgekehrt (MAYER und ANTHONY 2007). Diese Effekte sind bei kumulativen Dosen von 10 Gy (2 Gy/Fraktion) zu erwarten, bei 40 Gy (2 Gy/Fraktion) entsteht bei 50 % der Patienten eine permanente Alopezie (HERRMANN et al. 2006a). Bereits Einzelbestrahlungen mit 4 Gy können zu temporärem Haarverlust binnen 10 Tagen führen (HERRMANN et al. 2006a). Die Veränderungen haben keinen Einfluss auf das Patientenwohlbefinden. Jedoch müssen die Patienten bzw. in der Veterinärmedizin die Besitzer im Voraus darauf hingewiesen werden.

Ein weit größeres Problem sind Fibrosen, eine abnehmende Anzahl an Kapillaren und die Entstehung von Teleangiektasien. Letztere sind ein Zeichen einer fortschreitenden Gefäßschädigung (DÖRR 2009a). Die hieraus entstehende Unterversorgung des Bindegewebes und der Epidermis führt zu chronischer Hypoxie und Atrophie (ULRICH et al. 2008). Nicht heilende Ulzerationen der Haut und des Bindegewebes sind die Folge. Hiermit sind Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und ein steigendes Infektionsrisiko verbunden.

### Orale Strahlenreaktionen

**Strahlenkaries** Strahlenkaries ist trotz ausreichender Mundhygiene und entsprechend prophylaktischer Maßnahmen ein häufiges Problem. In der Tiermedizin muss der Besitzer noch vor Beginn der Radiotherapie für die Problematik sensibilisiert werden. Vor Behandlungsbeginn ist eine sachgemäß durchgeführte Zahnsanierung essentiell. Die tägliche Mundhygiene kann noch vor Beginn der Therapie antrainiert werden.

Direkte Strahleneffekte manifestieren sich an der Dentin-Schmelzgrenze als Folge verminderter Stoffwechselleistung der Odontoblasten (Schmelzdemineralisierung). Zusätzlich führt die Bestrahlung zu Schäden an der Pulpa, was sich in einem schleichenden Vitalitätsverlust äußert (DÖRR et al. 2008). Hiermit geht eine geringe oder späte Schmerzwahrnehmung einher, sodass regelmäßige Zahnuntersuchungen trotz ausbleibender Zahnschmerzen essentiell sind (DÖRR et al. 2008). Neben diesen direkten Strahlenfolgen an den Zähnen tragen gestörte Speichelsekretion (Xerostomie) und veränderte Mundflora bzw. gestörten Mundhöhlen-Milieu meist zu sekundärer Strahlenkaries bei (SCHWEYEN et al. 2012, AL-NAWAS et al. 2001, HERRMANN et al. 2006a, SAUER und KEILHOLZ 2006). In Folge des Wegfalls des neutralisierenden Speichels entsteht ein saurer pH-Wert des Mundmilieus, welcher die Zahnhartsubstanz angreift.

Die Inzidenz kariöser Läsionen steigt nach Strahlentherapie für den gesamten Zahn um den Faktor 2 und für den Zahnhalsbereich um den Faktor 10 (PYYKÖNEN et al. 1986). Eine kumulative Dosis von 20 Gy gilt als obere Grenze, bei welcher es

nicht zu posttherapeutischer Strahlenkaries kommt (POYTON 1986). Die radiogene Zahnschädigung und die dadurch bedingten dentalen Maßnahmen sind Hauptursache für infizierte Osteoradionekrosen (SCHWEYEN et al. 2012, AL-NAWAS et al. 2001).

**Osteoradionekrose** Die Osteoradionekrose ist eine der schwerwiegendsten lokalen Nebenwirkungen einer Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich (DÖRR et al. 2008). Sie tritt im Bereich der Mandibula 1 bis 2 Jahre nach der Strahlentherapie auf (HERRMANN et al. 2006a). Infektionen der Mundhöhle oder Strahlenkaries-assoziierte zahnärztliche Maßnahmen nach ungenügender Zahnsanierung erhöhen das Risiko später Strahlenfolgen am Knochen (SCHWEYEN et al. 2012, DÖRR et al. 2008, HERRMANN et al. 2006a). Dieser Aspekt verdeutlicht die Notwendigkeit sachgemäß durchgeführter Zahnsanierungen bereits vor Behandlungsbeginn.

**Radioxerostomie** In der Frühphase sind Entzündungsprozesse der Speicheldrüsen Ursache für die Mundtrockenheit. Nach Abklingen der Entzündung (ca. 1 Jahr nach Therapieende) findet ein bindegewebiger Umbau des Drüsengewebes statt (DÖRR 2009a). Die Anzahl der Azinuszellen ist vermindert und wird durch fibrotisches Narbengewebe ersetzt. Initial sind die serösen Drüsenanteile, später auch die muzinösen Drüsen betroffen. Die Zusammensetzung des Speichels ist eine Hauptkomponente für die Entstehung von Strahlenkaries und Osteoradionekrose. Zusätzlich führt die chronische Mundtrockenheit zu einem verminderten Appetit; einseitige Nahrungsaufnahme und Gewichtsverlust können die Folge sein. Die fehlende Speichelproduktion muss über geeignete Nahrung (in der Tiermedizin: Naßfutter oder in Wasser eingeweichtes Trockenfutter) kompensiert werden.

**Trismus** Trismus ist eine arthrogene und/oder extraartikuläre Kieferklemme, die zum teilweisen oder vollständigen Unvermögen der Kieferöffnung führt. Sie ist die Folge strahlenbedingter Veränderungen an dem im Zielvolumen lokalisierten Kiefergelenksanteile und/oder der beteiligten Kaumuskulatur. Die Kieferklemme tritt bei bis zu 50 % der Patienten auf (KENT et al. 2008).

### **Auge und Linse**

Die Linse ist die strahlenempfindlichste Struktur des Auges. Die Bestrahlung führt zu einem epithelialen Schaden in der Proliferationszone der Linse. Die Linsenfasern lagern Vakuolen ein und behalten z.T. den Nukleus. Bereits nach fraktionierten Dosen von 4-5 Gy (kumulativ) oder deutlich unter 1 Gy bei Einzeitbestrahlung kann eine radiogene Katarakt induziert werden (DÖRR 2009a). Die Latenzzeit ist invers zur applizierten Dosis und beträgt 6 Monate bis mehrere Jahrzehnte (DÖRR 2009a).

Die Linsenveränderungen können durch den chirurgischen Einsatz einer künstlichen Linse behoben werden.

Das chronisch trockene Auge wird als wichtigste Komplikation einer Augenbestrahlung eingeschätzt (HERRMANN et al. 2006a). Durch Strahlenschäden an den Tränendrüsen ist die Produktion des Tränenfilms vermindert. Konsekution chronischer Hornhautulzerationen können letztendlich zum Verlust des Auges führen (DÖRR 2009a).

## 2.5 Einflußfaktoren der Strahlenempfindlichkeit

Die Effekte einer Strahlentherapie werden durch 4 Parameter bestimmt, welche als die “4 R’s der Radiotherapie“ zusammengefasst wurden (WITHERS 1975):

1. **Recovery** bzw. Erholungsvorgänge/Fraktionierungseffekt
2. **Repopulierung** (Zeitfaktor)
3. **Redistribution/Reassortment** (Zellzykluseffekte)
4. **Reoxygenierung**

STEEL (2002) erweiterte diese Liste durch die intrinsische Strahlenempfindlichkeit. DÖRR (2009a) fügte einen weiteren Parameter hinzu: das bestrahlte Organvolumen.

### 2.5.1 Intrinsische Strahlenempfindlichkeit

#### Stammzellkonzept

Die intrinsische Strahlensensitivität ist die genetisch determinierte Empfindlichkeit von Zellen oder Geweben gegenüber ionisierender Strahlung (DÖRR 1997, HERRMANN et al. 2006b, DÖRR 2009c). Das Stammzellkonzept besagt, dass die gewebliche Strahlenempfindlichkeit durch die Anzahl und intrinsische Strahlenempfindlichkeit der gewebeeigenen Stammzellen definiert wird.

Hierbei handelt es sich um eine Hypothese, da eine direkte Identifikation der Stammzellen anhand zellulär-morphologischer Eigenschaften in der großen Mehrzahl der Gewebe derzeit nicht möglich ist. Proliferative Transitzellen und ausdifferenzierte Funktionszellen haben keinen Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit des Gewebes. Jedoch können möglicherweise Zellen aus frühen Phasen der Differenzierung wieder in den Pool der Gewebstammzellen rekrutiert werden (DÖRR 1997, DÖRR 2009c).

#### Klonogenes Zellüberleben

Das Überleben einer Stammzelle ist definiert durch ihre Eigenschaft, unbegrenzt Nachkommen zu bilden. Als eine geeignete Methode, um die Fraktion überlebender Zellen nach Bestrahlung zu messen, gilt der Koloniebildungstest in vitro. In diesem wird diejenige Zelle als klonogene Zelle definiert, welche in der Lage ist, Kolonien mit mehr als 50 Tochterzellen zu bilden. Durch dieses Verfahren läßt sich die

$SF$  (*surviving fraction/Überlebensrate*) messen. Diese wird mathematisch als linear-quadratische Funktion der applizierten Strahlendosis ( $D$ ) beschrieben:

$$SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

Die Parameter  $\alpha$  [ $\text{Gy}^{-1}$ ] und  $\beta$  [ $\text{Gy}^{-2}$ ] sind zell-/gewebs- und strahlenartspezifische Konstanten. Für eine Einzeitbestrahlung resultiert die halblogarithmische grafische Darstellung des Zellüberlebens in einer typischen Schulterkurve entsprechend der Abbildung 1 (HERRMANN et al. 2006b). Im Anfangsteil der Kurve, d.h. bei geringen Dosen, zeigt sich eine Schulter, welche sich mit zunehmender Dosis verliert.

Ein Maß für die intrinsische Strahlenempfindlichkeit von Zellen gegenüber ionisierender Bestrahlung ist die SF2 (Überlebensrate klonogener Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy). SF2-Werte variieren für unterschiedlichen Zellarten erheblich (Herrmann et al. 2006b). Zur Beschreibung der Strahlenempfindlichkeit von Keratinozyten können durchschnittliche Werte von  $\alpha=0,2 \text{ Gy}^{-1}$  und  $\beta=0,02 \text{ Gy}^{-2}$  angenommen werden (DÖRR 1997). Somit beträgt die durchschnittliche Überlebensrate für 2 Gy 62 % und für 3 Gy 46 %.

Eine weitere Maßzahl, um die zelluläre Strahlenempfindlichkeit zu charakterisieren, ist die mittlere Überlebensdosis ( $D_0$ ). Die  $D_0$  ist die Dosis, die im exponentiellen Teil einer Zellüberlebenskurve eine Überlebensrate von 37 % bewirkt.

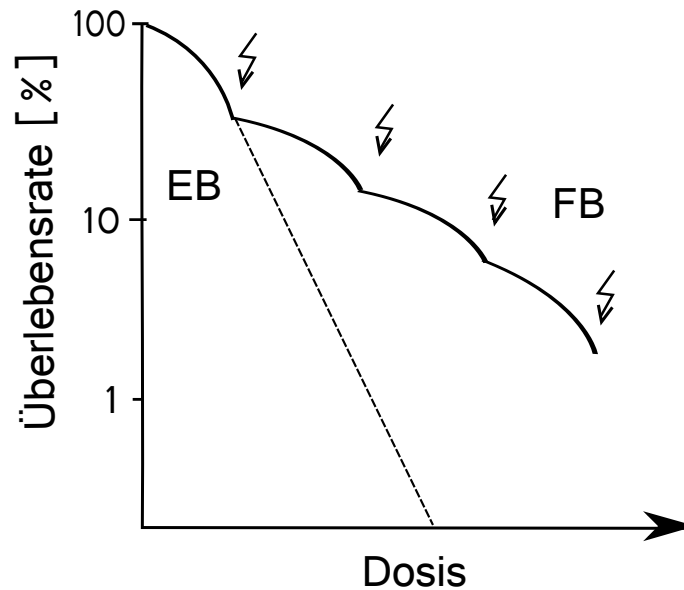


Abbildung 1: Zellüberlebenskurve nach Einzeit- (EB) und fraktionierter Bestrahlung (FB) (modifiziert nach HERRMANN et al. 2006a)

Bei hohen Dosen verläuft die Kurve exponentiell, welches sich in halblogarithmischer Darstellung als Gerade darstellt. Die Aufteilung der applizierten Dosis in einzelne Fraktionen führt zu einer Restitution der Schulter zwischen den Fraktionen. Der Fraktionierungseffekt ist bei Zellen mit einer ausgeprägten Schulter (kleines  $\alpha/\beta$ -Verhältnis, siehe 2.5.2) besonders ausgeprägt.

### 2.5.2 Erholung (Recovery)

Infolge einer Radiotherapie entstehen im betroffenen Gewebe letale und subletale Strahlenfolgen. Während die letalen Effekte zwingend zum Untergang von Zellen führen, müssen subletale Effekte dafür räumlich und zeitlich miteinander interagieren. Zwischen den Bestrahlungsfractionen kann ein Teil der subletalen Schäden repariert werden und steht damit bei der folgenden Fraktion nicht mehr für diese Interaktionen zur Verfügung. Die Aufteilung einer Gesamtdosis in mehrere kleine Fraktionen ergibt somit gegenüber der Einzeitbestrahlung eine geringere Wirkung; die Überlebensrate bei fraktionierter Bestrahlung liegt höher. Umgekehrt wird die Gesamtdosis zum Erreichen eines bestimmten Effektes (einer bestimmten Zellabtötungsrate) hierdurch erhöht.

Die Erholungskapazität wird im linear-quadratischen Modell durch den sogenannten  $\alpha/\beta$ -Wert beschrieben (THAMES et al. 1982). Sie korreliert mit der Ausprägung der Schulter der Zellüberlebenskurven. Bei einem kleinen  $\alpha/\beta$ -Wert ist der Erholungseffekt besonders ausgeprägt. Für die Mundschleimhaut ergibt sich ein durchschnittlicher  $\alpha/\beta$ -Wert von ca. 10 Gy (DÖRR 1997). Der Fraktionierungseffekt ist dementsprechend gering, konnte jedoch signifikant nachgewiesen werden (DÖRR et al. 1994).

Die Erholung folgt einer exponentiellen Kinetik mit einer Halbwertszeit von 2-3 Stunden (HERRMANN et al. 2006b). In der klinischen Anwendung müssen des-



halb mindestens 6-8 Stunden zwischen den Fraktionen eingehalten werden, um eine ausreichende Erholung zu gewährleisten (HERRMANN et al. 2006b).

### 2.5.3 Repopulierung

Umsatzgewebe und Tumoren reagieren auf eine zeitliche Ausdehnung der Strahlentherapie mit Regenerationsvorgängen (Repopulierung) bereits während der Therapie, was zu einer Zunahme der Strahlentoleranz führt; dieses Phänomen wird als Zeitfaktor bezeichnet. Repopulierungsvorgänge in Normalgeweben wie der Mundschleimhaut umfassen eine komplexe Neustrukturierung der proliferativen Organisation. Sie sind gekennzeichnet durch Asymmetrieverlust und Akzeleration der Stammzellteilungen und abortive Teilungen letal geschädigter Zellen (DÖRR 1997a, DÖRR 2003a, DÖRR 2009c). Asymmetrieverlust bedeutet, dass sich infolge der strahlenbedingten Abtötung von Stammzellen die überlebenden Stammzellen in 2 Tochterstammzellen anstatt in eine Stamm- und eine Transit- oder differenzierte Zelle teilen (symmetrische Zellteilung, siehe 2.4.1). Diese symmetrischen Stammzellteilungen erfolgen im Vergleich zur Teilungsaktivität im unbestrahlten Gewebe beschleunigt (Akzeleration) (DÖRR 1997a). Weiterhin führen bereits letal geschädigte Zellen noch eine gewisse Anzahl (bis zu 4) an Zellteilungen durch, bevor sie absterben oder differenzieren (abortive Zellteilung). Dies trägt signifikant zur Gesamtzellproduktion bei (DÖRR 1997a, DÖRR 2003a).

Repopulierungsvorgänge zeigen einen nichtlinearen zeitlichen Verlauf mit einer anfänglichen Verzögerung. Eine Verlängerung der Gesamtbehandlungszeit und zusätzliche Bestrahlungspausen geben dem Gewebe Zeit für Repopulierung und reduzieren damit Frühnebenwirkungen. Spät reagierende Gewebe profitieren von diesem Effekt nicht (mit der Ausnahme von konsekutiven Strahlenfolgen, siehe 2.4.3). Repopulierungsvorgänge beginnen in der Mundschleimhaut unter täglich fraktionierter Bestrahlung ca. eine Woche nach Therapiebeginn (DÖRR 2003b).

Die Gesamtbehandlungszeit hat jedoch auch Einfluss auf das zu bestrahlende Malignom. Die Anzahl klonogener Tumorzellen kann durch Proliferation oder vermindernden Zellverlust während einer fraktionierten Bestrahlung und in den Therapiepausen zunehmen (Repopulierung des Tumorgewebes) (HERRMANN et al. 2006c). Dieser Umstand kann zur Abnahme der lokalen Tumorkontrolle führen. Eine ungeplante Verlängerung der Gesamtbehandlungsdauer sollte deshalb unbedingt vermieden werden (BÜTOF und BAUMANN 2013).

### 2.5.4 Redistribution

Redistribution beschreibt die Rückverteilung von Zellen in unterschiedliche Zellzyklusphasen nach einer Strahlenexposition. Zellen sind in den Zellzyklusphasen unterschiedlich strahlensensitiv. Während der G<sub>2</sub>-Phase und Mitose sind die Zellen am empfindlichsten (HERRMANN et al. 2006b). Bei Bestrahlung einer gemischten

Zellpopulation werden bevorzugt die strahlenempfindlichen Zellen abgetötet. Die überlebenden Zellen verbleiben zunächst in einem G2-Block und durchlaufen anschließend gemeinsam die nächsten Zyklen (Synchronisation). Nach einer gewissen Zeit verteilen sich die Zellen aufgrund von (geringen) Unterschieden in der Zellzyklusdauer wieder über die Zyklusphasen (Redistribution). Diese Effekte sind bei der Bestrahlung von Zellkulturen gut nachweisbar. In Normalgeweben und Tumoren haben sie wahrscheinlich eine untergeordnete oder keine Bedeutung und sind zudem experimentell nur schwer zu charakterisieren (DÖRR 2010).

### 2.5.5 Reoxygenierung

Die Reoxygenierung ist für die Strahlenwirkung auf Tumoren von Bedeutung. Euoxische Zellen sind bis zu einem Faktor 3 radiosensitiver als anoxische Zellen (HERRMANN et al. 2006b). Durch schnelles Wachstum und ein unkoordiniertes Gefäßsystem innerhalb von Neoplasien entstehen minderversorgte Gewebsbereiche. Während einer Strahlentherapie und der damit verbundenen Reduktion der Interkapillardistanzen (Tumorschrumpfung), sowie die Abnahme des interstitiellen Druckes, wird das verbliebene Tumorgewebe wieder besser mit Sauerstoff versorgt (Reoxygenierung). Ebenso wirkt sich die Öffnung temporär verschlossener Gefäße oxygenierungsfördernd aus. Die reoxygenierten Zellen reagieren dann auf die nächste Strahlendosis deutlich strahlenempfindlicher. In Normalgeweben treten hypoxische Zellen kaum und nur in konstanter Zahl auf; Veränderungen des Sauerstoffgehaltes haben hier wahrscheinlich kaum Bedeutung (DÖRR 2010).

### 2.5.6 Bestrahtes Organvolumen

Die Weiterentwicklung der präzisen Bestrahlungsplanungsmethoden und -applikationstechniken hat zu einer zunehmenden Konformation des mit signifikanten Dosen exponierten Volumens mit dem geplanten Zielvolumen (Tumolvolumen) geführt. Dies ist assoziiert mit zunehmenden Inhomogenitäten in der Dosisverteilung in den benachbarten Risikoorganen (DÖRR 2009b).

WITHERS et al. (1988) beschreiben den Aufbau von Organen aus funktionellen Untereinheiten (FSU, functional subunit). Die FSU können in unterschiedlichen Organen parallel (z.B. in Leber, Lunge und Niere) oder seriell (z.B. Rückenmark, Darm oder Ösophagus) angeordnet sein. Bei serieller Organstruktur führt die (strahlenbedingte) Sterilisation einer FSU zum Ausfall der Funktion aller nachgeschalteten FSU (WITHERS et al. 1988). Das Risiko von Nebenwirkungen ist somit abhängig von einzelnen Dosisspitzen im Organ. Bei parallel angeordneten FSU führt erst die Sterilisation einer größeren Anzahl von FSU zu klinischen Nebenwirkungen. Der Volumeneffekt ist hier weniger von einzelnen Dosisspitzen, sondern von der Gesamtdosis im Organ abhängig. In der Realität ist jedoch kein Organ strikt parallel oder seriell aufgebaut (DÖRR 2009b).

In der Mundschleimhaut zeigt sich bezüglich der Volumeneffekte ein Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung der oralen Mukositis und der exponierten Fläche (BENTZEN et al. 2001). Zudem hängt die klinische Konsequenz der Mukositis von der Lokalisation ab; z.B. können die Symptome und deren Folgen deutlich reduziert werden, indem die Lippen vom Bestrahlungsvolumen ausgeschlossen werden.

## 2.6 Aufbau und Proliferationskinetik der Mundschleimhaut

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an der Mundschleimhaut von Mäusen durchgeführt. Im Folgenden soll deshalb vergleichend auf den anatomischen und den histologischen Aufbau der Zunge und der Mundschleimhaut von Mensch, Hund, Katze und Maus näher eingegangen werden.

### 2.6.1 Anatomie und Histologie der Zunge

Die Zunge wird von apikal nach caudal in 3 Bereiche untergliedert: die Zungenspitze (Apex linguae), der Zungenkörper (Corpus linguae) und die Zungenwurzel bzw. der Zungengrund (Radix linguae). Die Zungenunterseite liegt dem Mundhöhlenboden an und ist mit diesem caudal über das Zungenbändchen (Frenulum linguae) verbunden. Der Zungenrücken (Dorsum linguae) schmiegt sich dem Palatum molle und Palatum durum an. Diese Strukturen sind an der Reaktionskette des Schluckreflexes beteiligt.

Die Mundschleimhaut wird in 3 funktionelle Bereiche eingeteilt: mastikatorische, spezialisierte und auskleidende Mukosa (SCHROEDER 2000). Die spezialisierte Mukosa befindet sich auf dem Zungenrücken, diese Bereiche sind für Geschmack-, Tast- und Temperaturempfindungen verantwortlich. Das Epithel beinhaltet Tastkörperchen, Geschmacks- und mechanische Papillen. Mastikatorische Mukosa findet sich in den mechanisch besonders beanspruchten Bereichen, wie Zahnfleisch und hartem Gaumen. Kennzeichnend für die mechanisch stark beanspruchte Schleimhaut ist das vielschichtig verhornende Plattenepithel. Auskleidende Mukosa besteht aus mehrschichtig unverhornendem Plattenepithel. Sie befindet sich in wenig mechanisch beanspruchten Gebieten (Lippen und Vestibulum oris, Wangen, Mundhöhlenboden und Zungenunterseite, weicher Gaumen).

Das Zungenepithel ist durch eine Basalmembran von der Submukosa getrennt. Von der Basalmembran ausgehend sind 4 Zellschichten zu differenzieren. Der Basalmembran sitzt die *Basalzellschicht* auf. Sie zeichnet sich durch isoprismatische Zellen aus. Das Stratum basale geht fließend in das Stratum spinosum (*Stachelzellschicht*) über. Die polyedrischen Zellen sind über Desmosomen untereinander verbunden und liegen in mehreren Schichten übereinander. Teilungsfähige Zellen der Basalzellschicht und der Stachelzellschicht werden als ***Germinativschicht*** zusammengefasst. In diesem Bereich findet die gesamte Zellproliferation statt (DÖRR 1987).

Die **funktionelle Schicht** beschreibt alle postmitotischen, kernhaltigen Zellen, welche die obere *Stachelzellschicht* und alle Zellen der Körnerzellschicht beinhaltet (DÖRR 1997). Hier findet die Differenzierung und Migration der Zellen zur Oberfläche hin statt. Zellen des Stratum granulosum (*Körnerzellschicht*) zeichnen sich durch basophile Einschlüsse (Keratohyalingranula) und eine spindelförmige oder stark abgeflachte Morphologie aus. Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum bilden zusammen das Stratum profundum.

Die abschließende Zellschicht (*Stratum superficiale*) wird durch das Stratum corneum gebildet. Diese Zellen sind tote, verhornte Epithelzellen, welche weder einen Zellkern noch -organellen enthalten. Keratohyalin wird zu Keratin umgewandelt.

### 2.6.2 Besonderheiten der humanen Mundschleimhaut

Beim Menschen variiert die Zellzahl des Epithels je nach Lokalisation. In Bereichen hoher Zelldichte findet sich auch eine hohe Proliferationsaktivität (DÖRR et al. 1995). Die Umsatzzeit (Zeitspanne, in der alle Zellen einmal erneuert werden) des gesamten Epithels ist dadurch nahezu einheitlich und beträgt ca. 5,7 Tage (DÖRR et al. 1995). Sie ist somit vergleichbar mit dem Epithel der Zungenunterseite der Maus.

Die Proliferation folgt einem zirkadianen Rhythmus. WARNAKULASURIYA und MacDONALD (1993) fanden ein Maximum der DNA-Synthese gegen 22.00 Uhr. BJARNASON et al. (1999) weisen dagegen die höchste S-Phasenaktivität zwischen 11.00 Uhr und 16.00 Uhr nach. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den Studien sind möglicherweise durch verschiedene Techniken zur Bestimmung der Zellzyklusphasen oder auch durch individuelle Unterschiede infolge eines unterschiedlichen Schlafverhaltens der Probanden und damit einer zeitlich unterschiedlichen Beanspruchung des Epithels zu erklären (BJARNASON et al. 1999).

### 2.6.3 Besonderheiten der kaninen Mundschleimhaut

Der kanine Zungenrücken ist von einer kutanen Schleimhaut überzogen. Papillae fungiformes sind im Bereich des Zungenkörpers lokalisiert und erfüllen Aufgaben der Mechano- und Thermorezeption. Am Übergang zum Zungengrund befinden sich zwei bis drei Papillae vallatae. Zahlreiche Geschmacksknospen befinden sich in der dem Wallgraben zugewandten Wand. In der Tiefe der Schleimhaut produzieren seröse Drüsen (VON EBENER-Spüldrüsen) dünnflüssiges Sekret. Am Zungengrund sind zottenförmige Papillae filiformes lokalisiert. Die Seitenränder und die Zungenunterseite sind von einem dünnen mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet, welches gut vaskularisiert ist und eine medikamentelle Resorption ermöglicht.

### 2.6.4 Besonderheiten der felines Mundschleimhaut

Die feline Zungenoberfläche ist von einer stark verhornten kutanen Schleimhaut überzogen. Rachenwärts gerichtete Hornspitzen (Papillae filiformes) sitzen jener

auf. Sie sind für die raue Zungenoberfläche verantwortlich. Neben mechanischen Papillen sind auf der Zungenoberfläche Geschmackspapillen (Papillae fungiformes und - vallatae) lokalisiert. Die Seitenränder und die Zungenunterseite ist von einem mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Hier finden sich einzelne Papillae fungiformes, welche als Mechano- und Thermorezeptoren fungieren. Das mehrschichtige Plattenepithel ist sehr gut durchblutet und ermöglicht perlinguale Resorption.

### 2.6.5 Besonderheiten der murinen Mundschleimhaut

Die Zunge der Maus hat eine Länge von etwa 10 mm, eine Breite von 5 mm und eine Dicke von 1,5 mm. Straffe Submukosa und Mukosa lagert quergestreifter Muskulatur, Binde-, Fett- und Drüsengewebe auf. In der Mukosa befinden sich vor allem auf der Zungenoberseite Geschmackspapillen. Mechanische Papillen finden sich ebenfalls auf dem Zungenrücken und an den Seitenflächen, wo sie bis zu ca. 1 mm auf die Zungenunterseite übergehen. Sie dienen u.a. der Fixierung der Nahrung und der Säuberung des Haarkleides. Somit erfüllt die Zunge wichtige Funktionen in der Nahrungsaufnahme, Durchfeuchtung der Nahrung bzw. Zerkleinerung und als Tast- und Geschmacksorgan. Die Zungenunterseite der Maus wird von einem mehrschichtigen *verhornenden* Plattenepithel bedeckt. Dieser Unterschied zur humanen Mundschleimhaut (weitgehend unverhornt) ist aus strahlenbiologischer Sicht jedoch vernachlässigbar, da für die Strahlenreaktion Proliferations- und initiale Differenzierungsprozesse die zentrale Rolle spielen und die terminale Differenzierung (verhornt/unverhornt) nahezu bedeutungslos ist (DÖRR 2009c).

Die gesamte Schleimhautdicke der Zungenunterseite der Maus des Inzuchtstammes CH3/Neu beträgt ca. 100  $\mu\text{m}$  (DÖRR 1997). Die Auswertung der Versuche beschränkte sich ausschließlich auf dieses Oberflächenepithel.

Der Aufbau des Epithels ist in Abb. 2 dargestellt. Die gesamte Zellneubildung findet in der Germinativschicht, bestehend aus Str. basale und den basalen Anteilen des Str. spinosum, statt. Die Differenzierung der postmitotischen Zellen resultiert letztendlich in der oberflächlichen Keratinschicht. Die Funktionsschicht besteht aus den oberflächlichen Anteilen der Stachelzellschicht und dem Str. granulosum.

Es besteht ein präzise reguliertes Gleichgewicht zwischen der Zellneubildung in der Germinativschicht und dem Zell-/Substanzverlust an der Epithel-Oberfläche. Der Zellverlust ist durch mechanische und/oder chemische Einflüsse (z.B. die Nahrungsaufnahme) bedingt (DÖRR 2003a, DÖRR 2009a, HERRMANN et al. 2006a, TROTT et al. 2002).

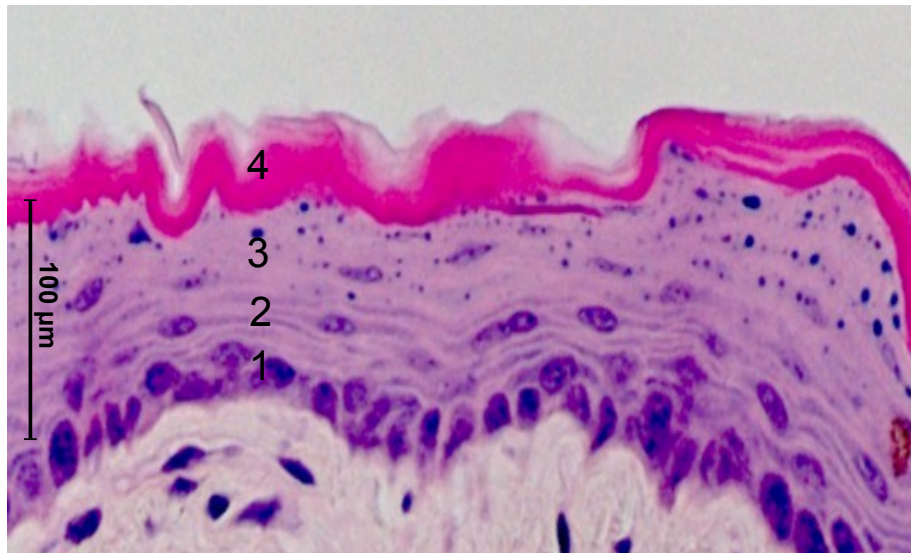


Abbildung 2: Histologischer Aufbau des mehrschichtigen verhornenden Plattenepithels der Zungenunterseite der Maus (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

Das Bild zeigt einen Ausschnitt des Zungenepithels der Maus nach HE-Färbung. Das Stratum basale (1) geht fließend in das Stratum spinosum (2) über. Die Basalzellschicht und die proliferierenden Anteile der Stachelzellschicht bilden zusammen die Germinativschicht. Die funktionelle Schicht wird durch nicht proliferierende Zellen des Stratum spinosum und Stratum granulosum (3) gebildet. Das Stratum corneum (4) besteht aus mehreren Lagen in Hornsubstanz (Keratin) umgewandelte Zellen.

Im Zungenepithel von Mäusen des Stammes C3H/Neu finden sich in der Germinativschicht 320 Zellen pro mm Epithellänge, im gesamten Epithel 400-430 Zellen pro mm Epithellänge (DÖRR 1997). Die Umsatzzeit (Zeitspanne, in der alle Zellen einmal erneuert werden) beträgt 3,6 Tage (Germinativschicht) bzw. 5 Tage (Gesamtepithel), wobei ca. 85 Zellen/mm Epithellänge täglich ersetzt werden (DÖRR 1997). Täglich durchlaufen verschiedene Zellkohorten ihren Zellzyklus von durchschnittlich 3-4 Tagen.

Die Proliferation des oralen Schleimhautepithels von Nagern unterliegt ebenfalls einem zirkadianem Rhythmus (DÖRR und KUMMERMEHR 1991, BURNS et al. 1975, GASSER et al. 1972, IZQUERDO und GIBBS 1972). Die Zellneubildung ist zeitlich vermutlich über die oberflächliche Abschilferung an die Nahrungsaufnahme gekoppelt, welche somit als Stimulus für die Zellproliferation fungiert (BURHOLT et al. 1985, BURHOLT 1986). Für das Epithel der Zungenunterseite von C3H/Neu-Mäusen wurde ein Mitosemaximum um 10.00 Uhr beobachtet (DÖRR 1987, DÖRR et al. 1994, DÖRR und KUMMERMEHR 1991). Diesem geht ein Maximum der

DNA-Synthese-Rate um 02:00 Uhr voraus (DÖRR und KUMMERMEHR 1991, DÖRR et al. 1994).

## 2.7 Verlauf und molekulare Pathogenese der radiogenen oralen Mukositis

In der Humanmedizin entwickeln beinahe alle Patienten, welche einer Radiotherapie von Kopf-Hals-Tumoren unterzogen werden, eine orale Mukositis (KEEFE 2006). Die ersten Symptome zeigen sich ca. 9 Tage nach dem Erreichen einer Dosis von 20 Gy; die maximale Ausprägung wird ab der vierten Behandlungswoche erreicht (HERRMANN et al. 2006a, LARUE und GILLETTE 1996, LARUE und GILLETTE 2007, COLLEN und MAYER 2008). Anfangs wird eine Rötung der Schleimhaut (erythematöse Veränderungen), verbunden mit Schmerzen beobachtet, gefolgt von fokalen bis konfluierenden Erosionen und Ulzerationen (DÖRR et al. 2008, SCARDINA et al. 2010, SONIS 2011). Die Symptome klingen meist innerhalb mehrerer Wochen nach Beendigung der Radiotherapie ab (LARUE und GILLETTE 2007).

Im klinischen Verlauf der radiogenen Mucositis enoralis können somit vier Phasen unterschieden werden: die initiale vaskuläre/inflammatorische Phase, die epitheliale Phase, die ulzerativ-bakterielle Phase und die Heilungsphase (DÖRR et al. 2007, SCARDINA et al. 2010). Infolge der Bestrahlung der Schleimhaut werden komplexe Signalketten der intra- und interzellulären Kommunikation initiiert bzw. modifiziert. Alle an der Strahlenreaktion beteiligten Zellpopulationen (Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen der Gefäße und Makrophagen) sind in diese Prozesse involviert (DÖRR et al. 2008, DÖRR 2009a).

Ionisierende Strahlung erzeugt in den Zellen reaktive Sauerstoffradikale (ROS), welche direkt oder indirekt zu Schäden an der DNA führen. Eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (u.a. NF- $\kappa$ B) ist die Folge (DÖRR et al. 2008, SONIS 2011). Während der initialen vaskulären Phase führt dies zu einer Aktivierung und Modulation von meist pro-inflammatorischen Signalkaskaden. Innerhalb kürzester Zeit kommt es im Gefäßendothel, Gefäßmedia und den Makrophagen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$ . U.a. produzieren Makrophagen nach Aktivierung das Enzym induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Die strahleninduzierte Aktivierung von Makrophagen in der Mundschleimhaut konnte bereits nachgewiesen werden (JAAL et al. 2010). Die hohen aus der iNOS-stammenden intrazellulären Stickoxid (NO)-Konzentrationen führen ihrerseits wiederum zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und halten die Signalverstärkung aufrecht. Die freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren führen direkt oder indirekt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Klinisch entspricht dies Rötung, vermehrte Gefäßzeichnung und Ödembildung (*vaskuläre/inflammatorische Phase*).

Die *epitheliale Phase* mit fokalen Erosionen, die sich zu konfluierender, pseudomem-

branösen Ulzerationen entwickeln, beruht auf einer epithelialen Hypoplasie bis hin zum vollständigen Zellverlust (Ulzeration) in Folge des Ungleichgewichts zwischen fortbestehendem Zellverlust und strahlenbedingt beeinträchtigter Zellproduktion. Deshalb bestimmt die Umsatzzeit des Gewebes den Zeitpunkt der klinischen Manifestation.

Ausgehend vom Zusammenbruch der normalen epithelialen Struktur, auf der die Barrierefunktion beruht, folgt häufig eine Phase sekundärer Infektionen, welche die Epithelreaktion wiederum verstärken können, und letztendlich sogar in septischen Zuständen enden können (*ulzerativ-bakterielle Phase*) (DÖRR et al. 2007).

Die Expression weiterer Zytokine und anderer Mediatoren, sowie die Rezeptoraktivierung in den Zellpopulationen resultiert u.a. in einer vermehrten Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und der Prostaglandinsynthase (DÖRR et al. 2008). Dieser Effekt beruht z.T. auf dem durch iNOS gebildeten NO, welches wiederum zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges führt (COLASANTI und SUZUKI 2000). Durch den NF- $\kappa$ B-Signalweg kommt es zu einer Reihe von Signalverstärkungen und Rückkopplungen im Rahmen der Mukositis (SONIS 2009). Bereits vor dem Zeitpunkt der maximalen klinischen Ausprägung sind unter den Pseudomembranen aus Fibrin bereits epitheliale Regenerationsprozesse nachzuweisen (DÖRR et al. 2008, DÖRR et al. 1995). Innerhalb von 4-6 Wochen nach Therapieende kommt es in der Regel zur vollständigen Reepithelialisierung (*Heilungsphase*). Die Heilungsphase geht von überlebenden oder aus unbestrahlten Gewebe eingewanderten proliferationsfähigen Zellen aus. Die Regeneration des Epithels erfolgt - außer bei sehr ausgeprägten Reaktionen - primär meist vollständig (DÖRR et al. 2008). Sekundär kann auf Basis der Gefäßschädigung eine Schleimhaut-Atrophie eintreten (DÖRR 2009a).

## 2.8 Stickstoffmonoxid

### 2.8.1 Eigenschaften

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein parakriner Mediator mit einer kurzen biologischen Halbwertszeit (2-3 s). Es ist beteiligt an der Neurotransmission, reguliert Genexpression, führt durch cGMP-abhängige Vorgänge zu Vasodilatation und ist u.a. in die Signaltransduktion bei Entzündungsprozessen involviert. An dieser Stelle soll nur auf die mögliche Beteiligung an der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut eingegangen werden.

### 2.8.2 NO-Synthese und iNOS-Aktivierung

Die Synthese von NO erfolgt aus der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). Bei diesem Vorgang entsteht die Aminosäure L-Citrullin (Abb. 3).



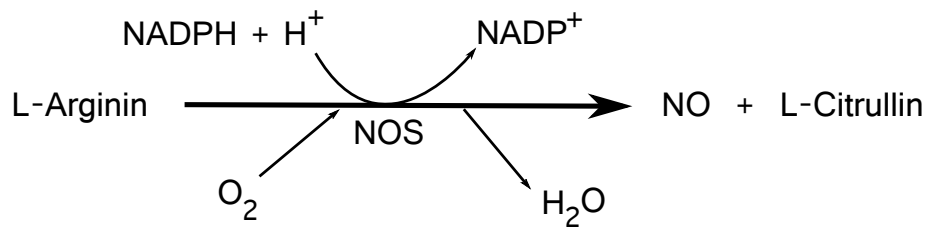


Abbildung 3: Reaktionsgleichung der NO-Synthese

Die Guanidin-Gruppe der Aminosäure L-Arginin wird in Gegenwart von Sauerstoff oxidiert. Hierbei entstehen die Produkte NO und L-Citrullin zu gleichen Mengen. Für die Reaktion wird Energie durch Abspaltung von einem Elektron von NADPH verbraucht. Als Nebenprodukte entstehen Wasser und  $\text{NADP}^+$ .

Es sind drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase bekannt: die neuronale (nNOS oder Typ I), die induzierbare (iNOS oder Typ II) und die endotheliale (eNOS oder Typ III) NO-Synthase. Typ I und III sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und werden konstitutiv exprimiert. Aus diesem Grund werden sie auch als cNOS zusammengefasst. Die induzierbare NOS (iNOS) ist  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und wird von über 15 Zelltypen, z.B. Keratinozyten und Makrophagen, exprimiert (NATHAN und XIE 1994a). Als Induktoren der Synthese von iNOS gelten u.a. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und entzündungsinduzierende Zytokine (COLASANTI und SUZUKI 2000, NATHAN und XIE 1994a). Zu letzteren zählen v.a. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

COLASANTI und SUZUKI (2000) beschreiben zusätzlich eine paradoxe Induktion der iNOS-Expression. Hierunter verstehen sie die Aktivierung des iNOS-Promotorgens, wenn die intrazelluläre physiologische NO-Konzentration (NO aus der cNOS) unter einen (undefinierten) Schwellenwert fällt. LPS und Zytokine führen zu einem Abfall der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, was wiederum eine geringere Aktivität der cNOS zur Folge hat. Mit dem damit einhergehenden Abfall der intrazellulären NO-Konzentration wird NF- $\kappa$ B aktiviert, welcher dann die iNOS-Expression induziert (COLASANTI und SUZUKI 2000, PERSCHINI et al. 2006). Hohe NO-Level sind die Folge, welche zusätzlich zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung beitragen und diesen Effekt verstärken.

Die folgende Abbildung (4) zeigt ein vereinfachtes Schema der iNOS-Aktivierung:

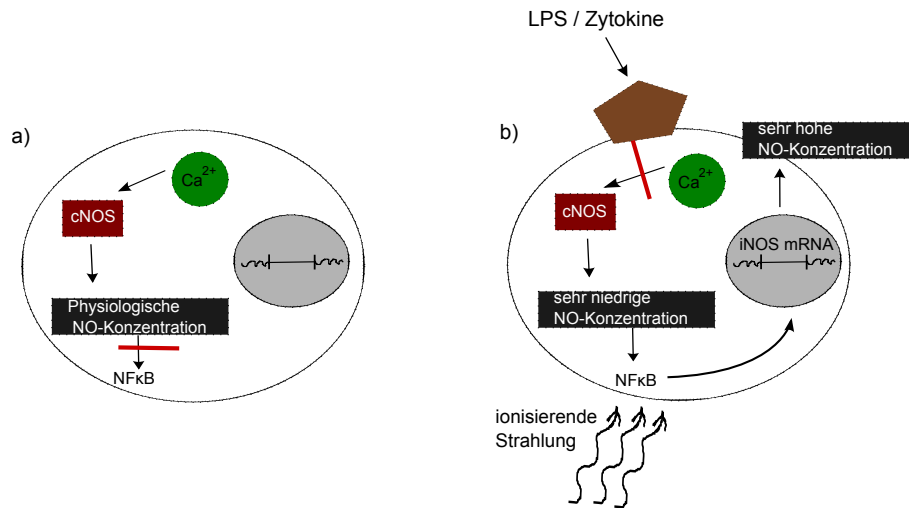


Abbildung 4: Regelkreis der NO-Synthese a) physiologische Bedingungen b) unter Einfluss von ionisierender Strahlung oder LPS/Zytokine (modifiziert nach PERSCHINI et al. 2006)

In der Abbildung ist schematisch die Regulierung der NO-Synthese unter a) physiologischen Bedingungen und b) bei Exposition mit ionisierender Strahlung bzw. unter Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen/Lipopolysacchariden (LPS) dargestellt. Sehr geringe NO-Konzentrationen bzw. oxidativer Stress aktivieren NF- $\kappa$ B und führen zur Synthese von iNOS.

### 2.8.3 Funktionen von NO

Stickstoffmonoxid ist als parakriner Botenstoff an komplexen Zellinteraktionen beteiligt; die Funktion ist z.T. gegenläufig, in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, einschließlich der Konzentration von NO und der Zellart bzw. dem Ort der NO-Synthese. Im folgenden soll auf Zellpopulationen und molekular-pathologische Prozesse, welche mit der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut in Verbindung stehen, eingegangen werden.

#### NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Immunabwehr

Unter physiologischen Bedingungen (geringe NO-Konzentration durch cNOS) wird eine Unterdrückung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch NO über 2 verschiedene Mechanismen beschrieben (COLASANTI und SUZUKI 2000). Zum Einen wird der NF- $\kappa$ B-Inhibitor induziert und stabilisiert, zum Anderen verhindert NO direkt die Bindung von NF- $\kappa$ B an die Promoterregion des iNOS-Gens durch Nitrosylierung von Cys62 der NF- $\kappa$ B p50-Untereinheit.

Im Rahmen von Entzündungsprozessen und der Erregerabwehr wird die cNOS durch LPS/proinflammatorische Zytokine inhibiert; sehr niedrige NO-Konzentrationen sind die Folge. Das führt zum Wegfall der Blockade des NF- $\kappa$ B-Inhibitors. Zusätzlich kommt es zur direkten Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch LPS/Zytokine bzw. durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS). Die Transkription des iNOS-Gens und die daraus folgende Synthese der iNOS führt zu hohen NO-Konzentrationen. Hohe NO-Konzentrationen führen im Gewebe zur Reaktion von NO mit Superoxid-Anionen

und es entstehen toxische Metabolite (u.a. Peroxynitrit und Hydroxylradikale). Dadurch wird eine antibakterielle, -virale, -parasitäre und -tumorale Wirkung beobachtet (COLOSANTI und SUZUKI 2000, KUBES 2000).

### Vasodilatation und Hämoperfusion

Endothelzellen der Gefäße synthetisieren unter physiologischen Bedingungen geringe Mengen an NO über eNOS. Über einen NO-cGMP vermittelten Mechanismus kann eine Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße mit Vasodilatation erreicht werden. JAAL et al. (2010) konnten eine strahleninduzierte Gefäßdilatation in der Mundschleimhaut nachweisen; diese könnte nach Strahlenexposition durch eine iNOS-Induktion bedingt sein. Eine Hemmung dieses Effektes könnte somit Auswirkungen auf den Strahleneffekt haben.

Stickstoffmonoxid unterdrückt weiterhin die Blutplättchenaggregation und -adhäsion durch Unterdrückung der Produktion von Gewebsfaktoren und Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PEREZ-RUIZ et al. 2002).

### Nozizeption

Schmerz ist ein für den Patienten wichtiges Symptom im Rahmen von Entzündungsprozessen. Die Freisetzung von Glutamaten und Substanz P induzieren NO, welches zu einer Modulation der Schmerzwahrnehmung führt (McMAHON et al. 2005). DE MOURA et al. (2004) weisen antinozizeptive Effekte durch Modulation des NO-cGMP-Signalweges nach.

## 2.9 L-NAME

L-NAME (Abb. 5) ist das Akronym für den formal-chemischen Namen G-nitro-L-Arginine-Methyl-Ester, L-Nitro-Arginine-Methyl-Ester oder N-Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester. Hierbei handelt es sich um eine biologisch inaktive Vorstufe von L-NNA (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine) (CARDNELL

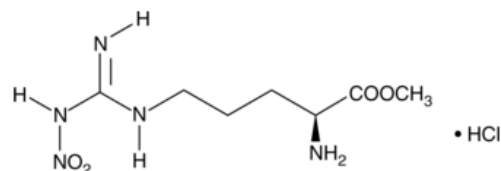


Abbildung 5:  
Strukturformel L-NAME  
(von CaymanChemical 2014)

und MIKKELSEN 2011), welches durch Hydrolyse von L-NAME mittels zellulärer Esterasen gebildet wird (GRIFFITH und KILBOURN 1996). L-NNA ist ein nichtselektiver Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-Inhibitor (MONCADA et al. 1991, NATHAN et al. 1994a). Es bewirkt eine effektive Hemmung der konstitutiven NOS-Isoformen und eine geringere Aktivität auf der induzierbaren NOS (FURFINE et al. 1993). Die cNOS-Hemmung ist beinahe 300fach effektiver als die iNOS-Inhibierung, da letztere leicht reversibel ist (FURFINE et al. 1993). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_i$  des biologisch-aktiven L-NNA für die iNOS reicht von 4 bis 65

$\mu\text{M}$  (FURFINE et al. 1993, ABU-SOUD et al. 1994). L-NNA hemmt u.a. iNOS in Makrophagen und die NO-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Die Hemmung am NOS-Rezeptor erfolgt kompetitiv (MONCADA et al. 1991, GRIFFITH und KILBOURN 1996).

KHAN et al. (2003) untersuchten strahleninduzierte DNA-Schäden innerhalb und an den Rändern eines Bestrahlungsfeldes der Lunge. Um die Konzentration von NO-Radikalen im Gewebe zu verringern wurde L-NAME verabreicht. Die Dosierungen für die L-NAME-Applikationen in experimentellen Untersuchungen reichen in der Literatur von 2 mg/kg (KHAN et al. 2003) bis 50 mg/kg (NEMEC et al. 2010).

## 2.10 Zielstellung der Arbeit

Die Rolle von NO im Rahmen der radiogenen Mucositis enoralis ist nicht geklärt. Makrophagen synthetisieren nach Aktivierung u.a. iNOS (NATHAN und XIE 1994b). Ein Anstieg der iNOS-Konzentration und damit des NO kann einen Einfluss auf den Verlauf und die Ausprägung der radiogenen Mucositis enoralis haben. Unter physiologischen Bedingungen liegt die intrazelluläre NO-Konzentration durch die Aktivität von cNOS in streng geregelten, niedrigen Konzentrationen. Bestrahlung führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Hieraus folgt eine Aktivierung der iNOS-Synthese (siehe Abschnitte 2.7 und 2.8.3). Hohe Konzentrationen von NO aktivieren ihrerseits wiederum NF- $\kappa$ B und stellen zusätzlich Reaktionspartner zur Bildung von toxischen Metaboliten dar. Des Weiteren bewirkt NO eine Vasodilatation durch Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße und eine damit verbundene Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Migration von Entzündungszellen. Die Aktivierung der iNOS und die daraus entstehenden hohen NO-Konzentrationen können somit eine Rolle in der Entstehung der radiogenen Mucositis enoralis haben.

Eine Modulation der iNOS-Synthese kann zu einer veränderten Strahlenreaktion der Mundschleimhaut führen. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Behandlung mit dem NOS-Inhibitor L-NAME auf die radiogene Schleimhautreaktion im etablierten Tiermodell der Zungenunterseite der Maus untersucht werden. Dafür erhalten die Versuchstiere L-NAME in einer Dosierung von 0,2 mg/kg/Injektion intraperitoneal über unterschiedliche Applikationsintervalle, in Kombination mit einer ein- bzw. zweiwöchigen Fraktionierung ( $5 \times 3$  Gy/Woche) bzw. Einzeitbestrahlung. Die L-NAME-Applikation erfolgt an den Bestrahlungstagen jeweils 30 Minuten vor der Bestrahlung. Als primärer, klinisch relevanter Endpunkt wird die Ulzeration der Schleimhaut, entsprechend einer konfluenten Schleimhautreaktion beim Menschen, analysiert. Sekundäre Endpunkte sind die zeitlichen Verlaufsparemeter (Latenzzeit, Dauer) der ulzerativen Schleimhautreaktion. Weiterführende histologische Untersuchungen umfassen die Charakterisierung verschiedener epithel-morphologischer Parameter für Behandlungsprotokolle mit zweiwöchiger fraktionierter Bestrahlung und verschiedenen Applikationsschemata von L-NAME.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

#### 3.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden Tierversuche durchgeführt. Die Landesdirektion Dresden als zuständige Genehmigungsbehörde erteilte die Genehmigung am 19.03.2010 mit dem Aktenzeichen 24-9168.11-1/2010-5. Alle Maßnahmen an den Tieren erfolgten entsprechend der aktuellen Tierschutz-Bestimmungen. Die Tötung der Tiere erfolgte tierschutzgerecht mittels Dislokation des Atlanto-Okzipital-Gelenkes.

##### 3.1.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Mäuse des Wildtyp-Inzuchtstammes C3H/Neu verwendet, welche aus der Versuchstierzucht der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden stammten. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere acht bis zwölf Wochen alt und wogen mindestens 20 g. Geschlechtsabhängige Unterschiede in Bezug auf die strahleninduzierte Mukositis konnten in früheren Studien nicht festgestellt werden (DÖRR et al. 2000). Aus diesem Grund wurden Mäuse beider Geschlechter für die Versuchsdurchführung genutzt. Zum Zeitpunkt der lokalen Bestrahlung erhielt jedes Tier eine Ohrlochmarkierung zur individuellen Kennzeichnung.

##### 3.1.1.2 Versuchstierhaltung

Die Unterbringung und Behandlung der Versuchstiere erfolgte in den Tierhaltungsräumen des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden. Alle Versuche fanden unter spezifiziert pathogenfreien (SPF-) Bedingungen statt. Eine Liste der Mikroorganismen, auf welche diesbezüglich getestet wurde, findet sich im Anhang.

Ein automatisch gesteuertes Lichtregime regulierte einen zwölf Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus; die Lichtphase begann um 7.00 Uhr und endete um 19.00 Uhr MEZ. Die Lichtqualität entsprach den gesetzlichen Vorgaben. Die Raumtemperatur von 22°C bis 24°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-60 % wurde über die Belüftungsanlage der Tierhaltungsräume reguliert.

Die Unterbringung der Mäuse erfolgte in Gruppen von bis zu zehn Tieren in Kunststoffkäfigen (Makrolon®, Größe 3, Tecniplast Pereg GmbH, Hohenpreißenburg). Eine Haube mit integrierten Grobfilter wurde zur Abdeckung genutzt. Zusätzlich zu Sägespan-Einstreu (Ssniff-Bedding  $\frac{3}{4}$  Faser, Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) wurden Pappschnitzel als Beschäftigungsmaterial zur Verfügung gestellt. Die Tiere erhielten autoklaviertes Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (ssniff R/M-H, Ssniff Spezialdiäten GmbH) ad libitum. Chloriertes Trinkwasser wurde ebenfalls ad libitum in handelsüblichen Plastik-Trinkflaschen für Mäuse angeboten.

Qualifiziertes Pflegepersonal übernahm die Versorgung und das Umsetzen der Mäuse in saubere Käfige. Letzteres erfolgte zweimal pro Woche und zusätzlich bei Bedarf. Zur Raumdesinfektion diente Terralin® protect (Firma Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt) in einer 2 %igen Gebrauchslösung, welches entsprechend eines vorgegebenen Desinfektionsplanes eingesetzt wurde. Bei der Oberflächendesinfektion fand Mikrocid® (ebenfalls Firma Schülke&Mayr GmbH) Anwendung.

### 3.1.2 Bestrahlungstechniken und Dosimetrie

Es kamen zwei verschiedene Bestrahlungsmethoden zum Einsatz, die perkutane Bestrahlung der gesamten Schnauze und die lokale Bestrahlung der Zungenunterseite. Die perkutane Bestrahlung erfolgte ohne Narkose der Tiere und ohne Manipulation an der Zunge. Hierbei wurden Dosen appliziert, welche nur zu subklinischen Schädigungen des Zungenepithels führten. Bei der lokalen Bestrahlung eines Testfeldes auf der Zungenunterseite mussten die Tiere zur Immobilisierung anästhesiert werden. Durch die lokale Bestrahlung mit gestaffelten Dosen wurde mit dosisabhängiger Inzidenz ein makroskopisch diagnostizierbarer Strahleneffekt im Epithel induziert. Letztere Technik wurde abschließend bei fraktionierten Bestrahlungsprotokollen sowie bei Einzeitbestrahlungen angewandt.

Die Bestrahlung der Mäuse erfolgte jeweils um ca. 10:00 Uhr im Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden mit einer Bestrahlungsanlage YXLON Y.TU 320-D03 der Firma YXLON International X-Ray GmbH. Die applizierte Strahlendosis wurde über die Bestrahlungszeit definiert; nach Ablauf des eingestellten Zeitintervalls schaltete sich die Anlage automatisch ab.

### 3.1.2.1 Perkutane Bestrahlung

Die perkutane Bestrahlung der Mäuseschnauzen fand mit einer Röhrenspannung von 200 kV statt. Bei dem eingesetzten Röhrenstrom von 20 mA betrug die Dosisleistung im Fokus-Objekt-Abstand von 47 cm 0,984 Gy pro Minute.

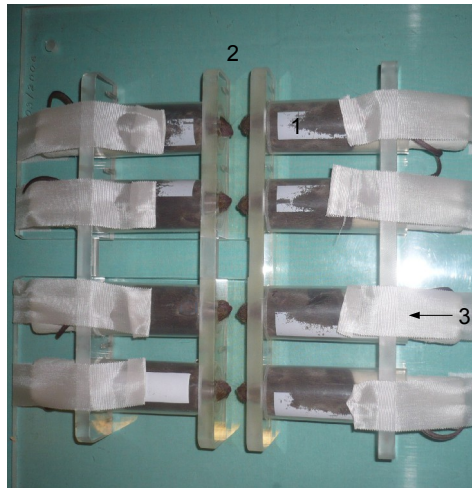


Abbildung 6: Plexiglasplatte zur Fixierung der Tiere und Positionierung der Mäuseschnauzen während der perkutanen Bestrahlung

Auf der rechteckigen Plexiglasplatte befanden sich 8 Kunststoffröhren (1) zur Fixierung der Tiere. Die exakte Positionierung der Schnauzen im Zentralstrahl erfolgte durch eine konische Bohrung in einem Plexiglasblock (2) am Vorderende der Röhren. Durch einen rückwärtig eingeführten Kunststoffstopfen (3) wurde das Zurückweichen der Tiere verhindert.

Auf einer  $30 \cdot 33 \text{ cm}^2$  großen Plexiglasplatte wurden acht Plastikröhren mit einem Innendurchmesser von 2,8 cm und einer Länge von 9,7 cm befestigt (Abbildung 6). Den vorderen Abschluß der Röhren bildeten Plexiglasleisten mit konischen Bohrungen, welche sich von 1,0 cm auf 0,6 cm verjüngten. In diesen war die Fixierung der Mäuseschnauzen in reproduzierbarer Weise ohne Narkose möglich, ohne Atmung der Tiere einzuschränken. Durch den rückwärtigen Verschluss der Röhren durch einen unter sanftem Druck fixierten Polystyrolstopfen wurde das Zurückweichen der Tiere verhindert.

Die Strahlenführung war vertikal. Die Strahlfilterung bestand aus dem Eigenfilter der Anlage aus Beryllium und Aluminium (je 3,0 mm Dicke) sowie 1,0 mm Aluminium und 0,6 mm Kupfer. Letztere waren in das Bestrahlungsfenster der Kollimatorplatte integriert. Diese Kollimatorplatte ( $30 \cdot 33 \cdot 1,5 \text{ cm}^3$ ), welche in der Werkstatt der Klinik und Poliklinik für Strahlenbiologie und Radioonkologie aus dem Blei-Äquivalent MCP-96 (Fa. HEK Medizintechnik, Lübeck) gefertigt wurde, befand sich auf einem Metallrahmen über den Mäusen. So erfolgte die Abschirmung der Tiere kaudal einer

Transversalebene kurz vor dem Ohrgrund.

Jeweils vor der Bestrahlung wurde eine physikalische Dosimetrie durchgeführt. Hierfür diente ein Dosimeter Unidos 11377 (PTW Unidos, Freiburg). Über einen flexiblen Gummischlauch war die Ionisationskammer vom Typ Nr. TM31010-1052 mit dem Dosimeter verbunden. Das Ionisationskammervolumen betrug  $0,125 \text{ cm}^3$ . Der aktuelle Luftdruck zur Luftdichtekorrektur entsprechend den Herstellervorgaben wurde dem Wetterportal [www.wetter.com](http://www.wetter.com) der Wetterstation Dresden-Klotzsche entnommen.

Die Ionisationskammer befand sich dabei in äquivalenter Position zu den Schnauzen der Tiere. Nach einminütiger Vorlaufzeit der Röhre wurden nach jeweils einer Minute 3 Werte ermittelt und die Äquivalenz zu den Referenzwerten der Medizinphysiker der Klinik und Poliklinik für Strahlenbiologie und Radioonkologie geprüft. Die vorgegebenen Dosen entsprachen den Dosen im Schleimhautepithel, eine Schwächung der Dosis durch die Schädelkalotte konnte vernachlässigt werden. Die Dosisverteilung in der oralen Mukosa war homogen.

### 3.1.2.2 Lokale Bestrahlung der Zungenunterseite

Die Bestrahlung fand unter Anästhesie zur Immobilisation statt; die Tiere erhielten Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Firma Merial) in einer Dosierung von ca.  $60 \text{ mg/kg}$ . Nach Einsetzen der Narkosewirkung wurde die Zunge mit einer Pinzette vorsichtig aus der Maulhöhle vorgelagert. Die Tiere wurden in Rückenlage in die zentrale Bohrung (Innendurchmesser  $3,6 \text{ cm}$ ) in einem  $3,3 \cdot 4 \cdot 13 \text{ cm}^3$  Aluminiumblock verbracht. Durch eine kleine Öffnung ( $3 \text{ mm}$  Durchmesser) im Dach des Aluminiumblockes wurde die vorgelagerte Zunge vorsichtig mit einer Pinzette nach außen geführt. Die Zunge wurde mit Heftpflaster (Durapore TM) an der Zungenspitze fixiert, so dass die Zungenoberseite der Oberseite des Blockes anlag (Abbildung 7 [1]). Die Definition des Bestrahlungsfeldes erfolgte durch eine  $3 \cdot 3 \text{ mm}^2$  große Aussparung in einem  $1 \text{ mm}$  dicken Aluminiumplättchen ( $20 \cdot 40 \text{ mm}^2$ ) (Abbildung 7[2]). Um eine Kompression der Zunge zu vermeiden, waren die Ränder des Plättchens um  $1 \text{ mm}$  erhöht. Das Bestrahlungsfeld wurde zentral auf der Zungenunterseite positioniert. Ein Styroporkeil wurde unter dem Kopf eingeführt, um eine Hypoxie durch Zug am Zungengrund vorzubeugen (Abbildung 7[3]). Die Vorwärmung des Blockes mittels handelsüblicher Heizdecken auf ca.  $35^\circ\text{C}$  verhinderte ein Auskühlen der Mäuse. Eine standardisierte Positionierung der Zunge im Zentralstrahl wurde durch Führungsschienen für den Aluminiumblock in einer entsprechenden Halterung unter dem Röhrenfenster erreicht (Abbildung 7[4]). Die Filterung erfolgte über einen  $1,0 \text{ mm}$  dicken Aluminiumfilter (Abbildung 7[4a]). Zur Abschirmung des Tierkörpers zusätzlich zum Aluminiumblock wurde eine Bleiabdeckung von  $1 \text{ mm}$  Dicke in eine entsprechende Vorrichtung auf den Abschirmblock geschoben (Abbildung 7[4b]).



Für die lokale Bestrahlung der Zungenunterseite wurde eine Röhrenspannung von 25 kV bei einem Röhrenstrom von 20 mA verwendet. Die Strahlführung war vertikal. Die Eigenfilterung der Anlage erfolgte über den 3,0 mm starken Berylliumfilter. Die Dosisleistung im Fokus-Objekt-Abstand von 14,5 cm betrug 4,6 Gy/min.

Die Dosimetrie erfolgt analog zur Schnauzenbestrahlung in zungenäquivalenter Position im Zentralstrahl. Es wurde eine Ionisationskammer Typ TM31010-1052 mit einem Volumen von 0,125 cm<sup>3</sup> verwendet.

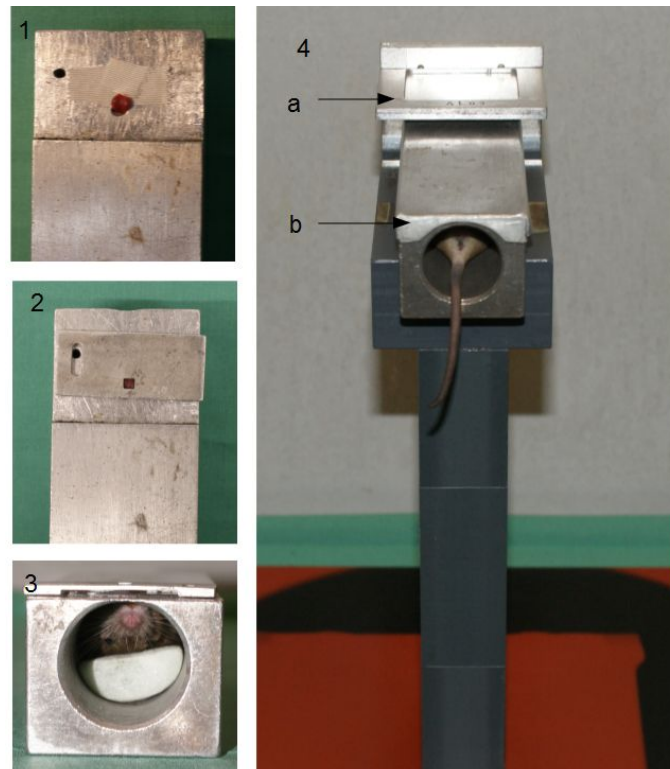


Abbildung 7: Vorrichtung zur lokalen Bestrahlung

Die Zunge wurde mit Heftpflaster an der Zungenspitze fixiert (1). Die Definition des Bestrahlungsfeldes erfolgte durch eine 3·3 mm<sup>2</sup> große Aussparung in einem 1 mm dicken Aluminiumplättchen (20·40 mm<sup>2</sup>) (2). Ein Styroporkeil wurde unter dem Kopf eingeführt, um einer Hypoxie durch Zug am Zungengrund vorzubeugen (3). Eine standardisierte Positionierung der Zunge im Zentralstrahl wurde durch Führungsschienen für den Aluminiumblock in einer entsprechenden Halterung unter dem Röhrenfenster erreicht (4). Die Filterung erfolgte über einen 1,0 mm dicken Aluminiumfilter (4a). Zur Abschirmung des Tierkörpers wurde eine Bleiabdeckung von 1 mm Dicke in eine entsprechende Vorrichtung auf den Abschirmblock geschoben (4b).

### 3.1.3 Klinische Beurteilung der Strahlenreaktion

Um eine Bewertung des Feldes auf der Zungenunterseite durchzuführen, erhielten die Mäuse Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Firma Merial) in einer sedativen

Dosierung von 40 mg/kg intraperitoneal. Die Sedation setzte nach ca. zehn Minuten ein und hielt ungefähr zehn bis fünfzehn Minuten an.

Die Zunge wurde vorsichtig mit einer Pinzette lateral der Nagezähne aus dem Maul vorgelagert. Der Vermeidung einer Manipulation des Testfeldes durch die Pinzette kam hierbei besondere Beachtung zu. Die Begutachtung erfolgte mit bloßem Auge unter Kunstlicht (handelsübliche Halogen-Schreibtischlampe).

Alle Mäuse wurden vom Auftreten erster Zeichen der Strahlenreaktion bis zum Ende des Experimentes (Abheilung aller aufgetretenen Ulzera) täglich am Vormittag untersucht.

Zur quantitativen makroskopischen Beurteilung der Zungenunterseite wurden die Parameter Hornschuppenbildung und Ulzeration bewertet und protokolliert (siehe Tabelle 3). Die Graduierung der Desquamation fand in drei Ausbildungsgraden (+ bis +++) statt. Ulzerative Läsionen wurden als quantaler Effekt in einem Ja/Nein-Schema dokumentiert. Die vollständige Reepithelisierung der ulzerativen Läsionen wurde ebenfalls in einem Ja/Nein-Schlüssel erfasst. Zusätzlich zur Adspektion der Zungenunterseite wurden die Tiere alle zwei Tage gewogen und das Körpergewicht dokumentiert.

Tabelle 3: Klinische Parameter zur Beurteilung der Strahlenreaktionen

Symptom	Bewertungsschlüssel
keine Veränderung	–
Desquamation	+    ++    +++
Ulzeration	ja/nein
Reepithelisierung	ja/nein

#### 3.1.3.1 N5-[imino(nitroamino)methyl]-L-ornithine, methylester, monohydrochloride (L-NAME)

Das Medikament L-NAME wurde von der Firma Cayman Chemical Company, USA, bezogen. Die formale chemische Bezeichnung lautet N5-[IMINO(NITROAMINO)-METHYL]-L-ORNITHINE, METHYLESTER, MONOHYDROCHLORID. Der kristalline Feststoff war bei einer Lagerung bei -20°C ein Jahr haltbar. Die Lösung in physiologischer Kochsalzlösung (1 g L-NAME/30 ml physiologische Kochsalzlösung) erfolgte unter aseptischen Bedingungen unmittelbar vor der Anwendung. L-NAME wurde intraperitoneal in einer Dosierung von 0,2 mg/kg pro Injektion verabreicht.

#### 3.1.4 Beschreibung der Experimente

Die Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die durchgeführten Versuche.

Tabelle 4: Übersicht über die durchgeführten Versuche

Art der Bestrahlung	Versuchsnummer	Applikationszeitraum <sup>§</sup> (erster/letzter Tag)	Dosisgruppen [Gy]
Einzeitbestrahlung	EK	—	7,0; 10,0; 12,0; 14,0; 17,0
	E1	-3/D	9,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0
	E2	-3/H	9,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0
1 Woche fraktionierte Bestrahlung (5 Fraktionen, Tag 0 - 4)	5FK	—	5,0; 8,0; 10,0; 12,0; 15,0
	5F1	-3/6	8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 17,0
	5F2	-3/D	8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 17,0
	5F3	-3/H	8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 17,0
2 Wochen fraktionierte Bestrahlung (10 Fraktionen, Tag 0 - 4 und Tag 7 - 11)	10FK	—	6,0; 9,0; 11,0; 13,0; 16,0
	10F1	-3/6	8,0; 11,0; 13,0; 15,0; 18,0
	10F2	-3/14	8,0; 11,0; 13,0; 15,0; 18,0
	10F3	-3/D	8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 17,0
	10F4	-3/H	8,0; 11,0; 13,0; 15,0; 18,0
	10F5	7/14	7,0; 11,0; 13,0; 15,0; 18,0

<sup>§</sup> D: Erstdiagnose der Ulzeration H: Ausheilung (makroskopisch) aller bestehenden Ulzerationen

#### 3.1.4.1 Alleinige L-Name-Gabe

Bei 5 Tieren wurde das Medikament über einen Zeitraum von 25 Tagen täglich um 10:00 Uhr appliziert.

#### 3.1.4.2 Lokale Einzeitbestrahlung

##### Alleinige Einzeitbestrahlung (Versuch EK)

Ein Versuch mit alleiniger Einzeitbestrahlung diente als generelle Kontrolle für alle weiteren Analysen. Insgesamt 50 Tiere wurden in 5 Dosisgruppen zu je 10 Mäusen bestrahlt. Die Bestrahlung fand am Vormittag zwischen 9 und 12 Uhr statt.

### **Lokale Einzeitbestrahlung mit L-NAME-Applikation**

L-NAME wurde in diesen Versuchen ab 3 Tagen vor Strahlenexposition bis zur Erstdiagnose (Versuch E1) bzw. bis zur Ausheilung (Versuch E2) der Ulzera appliziert. Die L-NAME-Applikation fand an Bestrahlungstagen 30 Minuten vor Bestrahlung statt. Die Bestrahlung der Tiere erfolgte am frühen Vormittag. Tiere, welche keine Ulzeration der Schleimhaut entwickelten, erhielten L-NAME bis zu dem Tag, an dem erstmals keine neuen Reagenten auftraten (Versuch E1) bzw. bis zur Ausheilung aller bestehenden Ulzerationen im Versuch (Versuch E2).

#### **3.1.4.3 Fraktionierte Bestrahlung über 1 Woche**

##### **Alleinige Bestrahlung (Versuch 5FK)**

In diesem Versuch (5FK) wurden 50 Tiere täglich zwischen 9 und 12 Uhr von Tag 0 bis Tag 4 mit 3 Gy bestrahlt (Schnauzenbestrahlung). Am 7. Tag fand die lokale Bestrahlung (Testbestrahlung) in 5 gestaffelten Dosisgruppen statt. Letztere erfolgte zwischen 9 und 11 Uhr.

##### **L-NAME-Gabe in 3 Zeiträumen**

Die Bestrahlung (jeweils zwischen 9 und 11 Uhr) erfolgte analog zu Versuch 5FK. Die L-NAME-Gabe begann jeweils drei Tage vor der ersten Strahlenexposition (Tag -3). An den Bestrahlungstagen erfolgte die Substanzapplikation jeweils 30 Minuten vor Bestrahlung. Die Medikamentenapplikation erfolgte bis einen Tag vor der lokalen Bestrahlung (Tag 6) (Versuch 5F1), bis zur Erstdiagnose (Versuch 5F2) oder bis zur Ausheilung der bestehenden Ulzerationen (Versuch 5F3). Bei Nicht-Reagenten erfolgte die Applikation bis zu dem Tag, an dem erstmals keine neuen Reagenten auftraten (Versuch 5F2) bzw. bis zur Ausheilung aller Ulzerationen in diesem Versuch (Versuch 5F3).

#### **3.1.4.4 Fraktionierte Bestrahlung über 2 Wochen**

##### **Alleinige Bestrahlung (Versuch 10FK)**

Die zweiwöchig fraktionierte Bestrahlung (Schnauzenbestrahlung) erfolgte von Tag 0 bis Tag 4 und von Tag 7 bis Tag 11 mit 3 Gy/Tag am Vormittag. Am Tag 14 wurden die Zungen lokal mit gestaffelten Dosen bestrahlt (10FK). Dabei werden 5 Dosisgruppen mit je 10 Tieren gebildet.

##### **L-NAME-Gabe in 5 Zeiträumen**

Die Bestrahlung erfolgte jeweils am Vormittag zwischen 9 und 11 Uhr. L-NAME wurde ab dem 3. Tag vor Strahlenexposition bis Tag 6 (Versuch 10F1), Tag 14 (Versuch 10F2), zum Tag der Erstdiagnose (Versuch 10F3) oder zum Tag der Ausheilung aller Ulzerationen (10F4) 30 Minuten vor Bestrahlung gegeben. Im Versuch 10F5 fand die Medikamentenapplikation von Tag 7 bis Tag 14, also nur in der 2.

Woche der fraktionierten Bestrahlung statt (ebenfalls 30 Minuten vor Bestrahlung). Bei Nicht-Reagenten erfolgte die Applikation bis zu dem Tag, an dem erstmals keine neuen Reagenten auftraten (Versuch 10F3) bzw. bis zur Ausheilung aller Ulzerationen in diesem Versuch (Versuch 10F4).

### 3.1.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Statistical Analysis System (SAS), Version 9.1.3 Service Pack 3 (SAS Institute Inc. 1990).

Als statistisch signifikant wurden in allen Analysen p-Werte  $\leq 0,05$  definiert.

#### 3.1.5.1 Dosis-Effekt-Beziehungen

Die Häufigkeit ulzerativer Läsionen war dosisabhängig und wurde als quantaler Endpunkt für die Erstellung von Dosis-Effekt-Beziehungen verwendet. Dosis-Effekt-Analysen werden mittels Probit-Analyse (GOGOLOK et al. 1992, SAS Institute 1990, SAS Institute 2012) unter Annahme einer logarithmischen Verteilungsfunktion (Logit-Analyse) ohne Definition eines Schwellenwertes durchgeführt. Aus der Probit-Analyse resultieren sigmoide Dosis-Effekt-Kurven, die durch den ED50-Wert (Dosis, bei der bei 50 % der Tiere ein Ulkus zu erwarten war) mit seiner Standardabweichung  $\sigma$  und dem 95 %-Vertrauensbereich charakterisiert wurden. In denjenigen Fällen, in denen eine Abschätzung der Dosisabhängigkeit der Reaktion mittels Probit-Analyse nicht möglich war (kein oder nur ein Datenpunkt mit einer Inzidenz zwischen 0 % und 100 %), wurde mittels Cochran-Armitage-Trend-Test geprüft, ob es einen monotonen Trend im Auftreten der Häufigkeit von Ulzerationen gab (SAS PROC FREQ) (GOGOLOK et al. 1992, SOMERS 1962). Die aus dieser Methode resultierenden p-Werte für die Dosisabhängigkeit sind im Text entsprechend gekennzeichnet.

Der Vergleich von Dosis-Effekt-Kurven erfolgt mit Hilfe des Likelihood-Ratio-Tests unter Verwendung des Logit-Modells (SAS Institute 1990, GOGOLOK et al. 1992). Falls ein Vergleich von Dosis-Effekt-Kurven zwischen einzelnen Versuchen mit dieser Methode nicht möglich war (kein oder nur ein Datenpunkt mit einer Inzidenz zwischen 0 % und 100 %), wurden jeweils die Dosis-Mittelwerte der Reagenten bzw. Nichtreagenten der einzelnen Versuche mittels zweiseitigem t-Test verglichen. Auch die hieraus resultierenden p-Werte für die Unterschiede zwischen den Versuchen sind im Text entsprechend gekennzeichnet.

#### 3.1.5.2 Zeitlicher Verlauf der makroskopischen Strahlenreaktion

Latenzzeit und Ulkurdauer dienten als Parameter für den zeitlichen Verlauf der ulzerativen Läsionen. Die **Latenzzeit** war der Zeitraum zwischen Bestrahlung und der

erstmaligen Diagnose des Ulkus. Als **Ulkusdauer** wurde die Zeit von der ersten Diagnose einer Ulzeration bis zur klinischen (makroskopischen) Heilung definiert. Mittlere Latenzzeit und mittlere Ulkusdauer wurden als arithmetische Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) für die einzelnen Dosisgruppen der Versuche sowie für alle Reagenten innerhalb der einzelnen Versuche berechnet (SAS PROC MEANS). Die Bewertung der Dosisabhängigkeit erfolgte mit einer linearen Regressions-Analyse (SAS PROC GLM). Zum Vergleich von Mittelwerten diente ein zweiseitiger t-Test (SAS PROC TTEST).

## 3.2 Histologische Untersuchungen

### 3.2.1 Bestrahlungsprotokolle

Entsprechend des Versuchsprotokolls 10FK erfolgte bei den Tieren des Versuches 10FHK ausschließlich die Strahlenapplikation von 5 Fraktionen/Woche bis zum Tag vor der Tötung, im Versuch 10FH1 erhielten die Tiere zusätzlich eine Behandlung mit L-NAME von Tag -3 bis zum Tag vor der Tötung. Die Applikation fand wie in den funktionellen Versuchen 30 Minuten vor der Bestrahlung statt.

Als Kontrolle für alle histologischen Untersuchungen dienten die Zungen von fünf unbehandelten, unbestrahlten Tieren (Versuch HK). Zu den Bestrahlungsversuchen erfolgte die Entnahme der Zungen von jeweils fünf Tieren pro Tag von Tag 1 bis Tag 25 in zweitägigen Abständen.

Die Bestrahlung und die Zungenentnahme fanden jeweils um 10:00 Uhr morgens statt.

### 3.2.2 Zungenentnahme und Fixierung

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dislokation des Atlanto-Okzipital-Gelenkes. Anschließend wurde der bewegliche Teil der Zungen mittels einer Schere am Zungengrund abgetrennt. Eine Fixierung der Zungen erfolgte für 24 bis 48 Stunden in Formalin. Die Zungen wurden anschließend mit einem Skalpell in der Medianen geteilt. In einer Histokinette (Leica EG 1160, Fa. Leica, Nussloch) wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert. Abschließend wurden die Präparate in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 2065, Fa. Reichert-Jung, Nussloch) wurden sagittale Schnitte von 3  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt. Jeweils zwei Schnitte einer Zunge wurden auf einem Objektträger aufgebracht.

### 3.2.3 HE-Färbung

Die Objektträger mit jeweils 2 Zungenschnitten wurden einem Standardfärbeprotokoll für Hämatoxylin und Eosin (HE, Reagenzien siehe Anang) entsprechend Tabelle 5 unterzogen.

Tabelle 5: Protokoll zur Färbung der HE-Schnitte

Zeitdauer	Arbeitsschritt
3-10 Minuten	Xylol
je 1 Minute	absteigende Alkoholreihe
1 Minute	Aqua dest.
17 Minuten	Mayers Hämalaun
5-10 Minuten	fließendes Leitungswasser
8 Minuten	Eosinlösung
kurz eintauchen	Ethanol 96 %
kurz eintauchen	Ethanol absolutus
kurz eintauchen	Xylol
eindecken	Entellan

### 3.2.4 Beurteilung der histologischen Schnitte

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Axio-plan, Fa. Zeiss Jena) bei 400facher Vergrößerung. Die Begutachtung der Zungenunterseite begann am Übergang vom papillenträgenden zum papillenfreien Epithel und endete am Zungengrund. Zur Einteilung der Gesichtsfelder diente ein quadratisches Zählraster mit einer Kantenlänge von 200  $\mu\text{m}$ , welches in 4-4 Quadrate (je 50  $\mu\text{m}$ ) unterteilt war. Die **Zellzahlen** wurden für die Germinativschicht und die postmitotische (funktionelle) Schicht ermittelt. An jeweils 3 repräsentativen Stellen wurde die **Epitheldicke** im apikalen Bereich, im mittleren Bereich und im Bereich des Zungengrundes gemessen. Die Dickenbestimmung erfolgte für das gesamte Epithel und anschließend separat für die Germinativ-, Funktions- und Keratinschicht.

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Aus den **Zellzahlen** der Gesichtsfelder der Zungen einzelnen Tiere wurde der arithmetische Mittelwert berechnet und auf eine Epithellänge von 1 mm normiert. Die geringgradigen Undulationen der Basalmembran fanden hierbei keine Beachtung. Aus den Mittelwerten der einzelnen Tiere jeder Entnahmegruppe wurde ein gemeinsamer Mittelwert und dessen Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SEM) berechnet.

Die Werte der **Epitheldicke** wurden analog zu den Berechnungen für die Zellzahlen zu einem Mittelwert für jedes Tier und anschließend zu einem gemeinsamen Mittelwert ( $\pm\text{SD}$ , SEM) aller Tiere eines Entnahmezeitpunktes je Versuch zusammengefasst.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Lokale Einzeitbestrahlung

#### 4.1.1 Klinische Symptomatik der Strahlenreaktion

Nach Einzeitbestrahlung treten erste klinische Symptome einer Strahlenreaktion in Form einer diffusen Rötung und Schwellung der gesamten Schleimhaut der Zungenunterseite mit einer Latenzzeit von 6-7 Tagen auf. Nach fraktionierter Bestrahlung werden bereits ab dem vierten Tag nach der lokalen Bestrahlung derartige Schleimhautreaktionen beobachtet.

In den folgenden 1-2 Tagen entwickelt sich eine vermehrte Hornschuppenbildung im Bestrahlungsfeld. Diese verleiht dem bestrahlten Areal ein rauhes Aussehen. Ab Tag 9 nach der lokalen Bestrahlung treten ulzerative Veränderungen der Mukosa auf. Diese Läsionen sind von einer weiß-gelblich schimmernden Pseudomembran bedeckt und im Vergleich zu der unbestrahlten Schleimhaut stufig eingesunken (Abbildung 8).

Die makroskopische Ausheilung erfolgt innerhalb weniger Tage, nach alleiniger lokaler Bestrahlung bis spätestens Tag 16. Sie ist aus jedem beschriebenen Stadium möglich.





Abbildung 8: Ulzerative Läsion der Zungenunterseite am Tag 10  
nach lokaler Bestrahlung mit 17 Gy

Dargestellt ist die ulzerative Veränderung der Zungenunterseite einer Maus am Tag 10 nach lokaler Bestrahlung mit 17 Gy. Die Läsion ist auf das  $3 \cdot 3 \text{ mm}^2$  große lokale Bestrahlungsfeld beschränkt.

#### 4.1.2 Zeitlicher Verlauf

Der Versuch KE (Einzeitbestrahlung ohne Medikamentenapplikation) dient der Beschreibung des zeitlichen Verlaufs und der Dosisabhängigkeit der Schleimhautreaktionen. Das Schleimhautepithel der Zungenunterseite wird mit gestaffelten Einzeldosen von 7 bis 17 Gy bestrahlt.

Einen Überblick über die Ergebnisse bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Strahlenreaktion gibt die Tabelle 6.

Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf nach der alleinigen Einzeitbestrahlung

Dosis [Gy]	Latenz [Tage]	SD	Dauer [Tage]	SD
7	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12	11	0	3	0
14	11	0,6	2,9	0,7
17	10,3	1,4	4,1	1
<b>gesamt</b>	<b>10,6</b>	<b>1,1</b>	<b>3,5</b>	<b>1,0</b>

In den niedrigsten Dosisgruppen zeigen sich keine Reagenten. Die mittlere Latenzzeit für den gesamten Versuch liegt bei 10,6 Tagen ( $\pm 1,1$  Tage). Die mittlere Ulkusdauer

beträgt 3,5 Tage ( $\pm 1,0$  Tage). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9 und 10 illustriert. Es ergibt sich keine signifikante Dosisabhängigkeit der Latenzzeit. Die Ulkusdauer nimmt mit steigender Dosis zu ( $p=0,0013$ ).

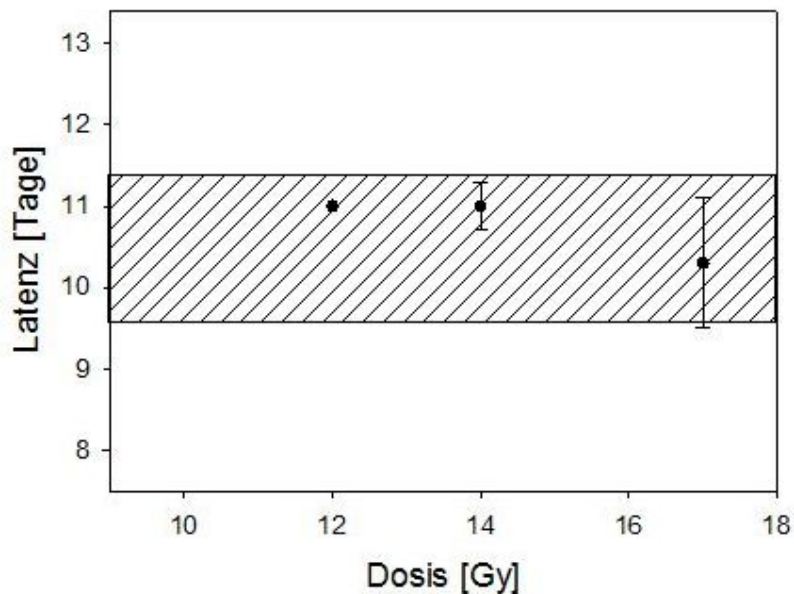


Abbildung 9: Latenzzeit in Abhängigkeit von der Strahlendosis

Die Abbildung zeigt die Latenzzeit der Reagenten in den einzelnen Dosisgruppen nach Einzeitbestrahlung. Der Mittelwert aller Reagenten beträgt 10,6 Tage (SD  $\pm 1,1$  Tage) und ist als schraffierter Bereich angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Dosisgruppenmittelwerte dar.

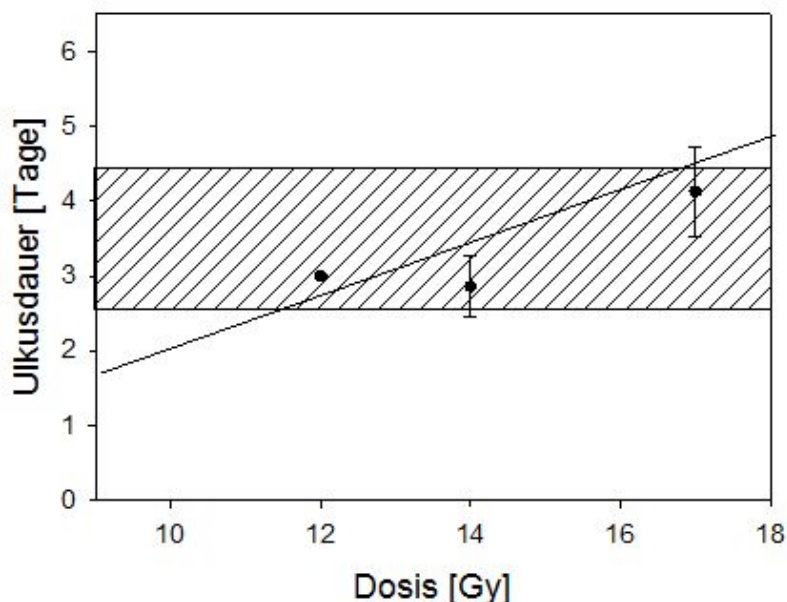


Abbildung 10: Ulkusdauer in Abhängigkeit von der Strahlendosis

Die Abbildung zeigt die Ulkusdauer der Reagenten in den einzelnen Dosisgruppen nach Einzeitbestrahlung. Der Mittelwert von 3,5 Tagen (SD  $\pm 1,0$  Tage) ist als schraffierter Bereich angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Dosisgruppenmittelwerte dar.

Abbildung 11 zeigt das Auftreten von Ulzerationen im Kontrollversuch mit Einzeitbestrahlung (KE) im zeitlichen Verlauf. Ab Tag 7 tritt in der höchsten Dosisgruppe der erste Reagent auf. Die höchste Prävalenz zeigt sich an den Tagen 11 und 12. Spätestens am Tag 16 sind alle strahleninduzierten mukosalen Defekte reepithelialisiert.

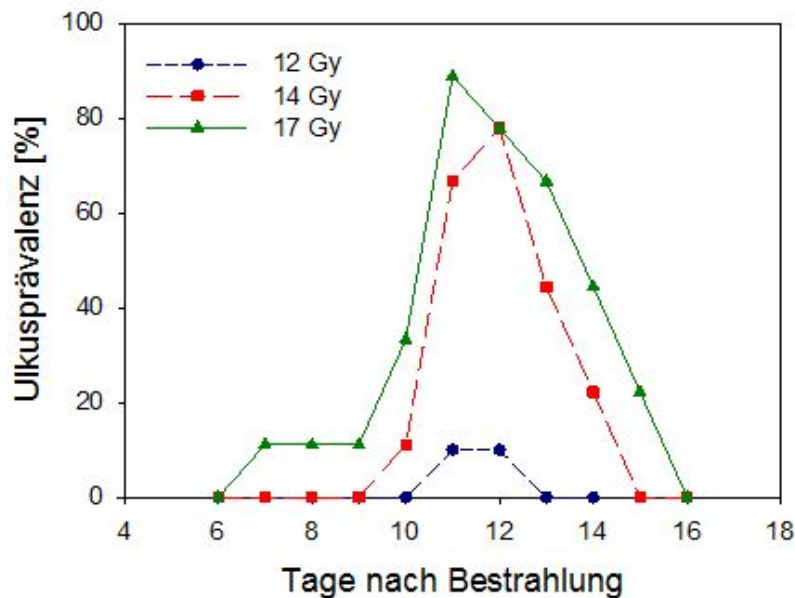


Abbildung 11: Ulkusprävalenz nach Einzeitbestrahlung (KE)

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Ulkusprävalenz des Versuches KE (alleinige Einzeitbestrahlung). In den Dosisgruppen 7 Gy und 10 Gy traten keine Reagenten auf.

### 4.1.3 Dosisabhängigkeit der Ulkusinzidenz

Die Dosis-Effekt-Kurve für die alleinige Einzeitbestrahlung des Versuches KE ist steil und gut definiert (Abbildung 12). Der p-Wert für die Dosisabhängigkeit der Reaktion beträgt 0,0013. Der ED<sub>50</sub>-Wert, bei welchem bei 50 % der Tiere eine Ulzeration zu erwarten ist, liegt bei 13,6 Gy, mit einem 95 %igem Vertrauensbereich von 12,6 bis 15,0 Gy.

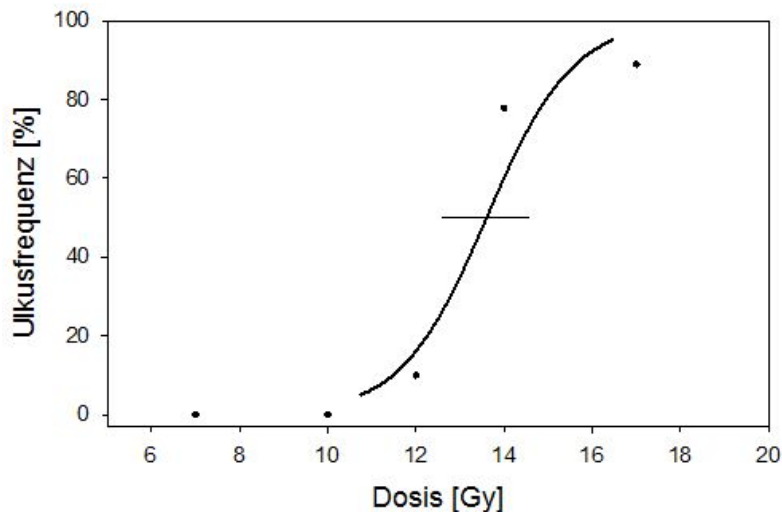


Abbildung 12: Dosisabhängigkeit der Ulkusinzidenz nach alleiniger Einzeitbestrahlung

Die Dosis-Effekt-Kurve wurde mit Hilfe der Probit-Analyse errechnet. Der Fehlerbalken stellt den 95 %-Vertrauensbereich der  $ED_{50}$  dar. Die Punkte zeigen die erfassten Ulkusfrequenzen.

#### 4.1.4 Gewichtsverlauf

Das Gewicht der Tiere wird beginnend mit dem Tag der Einzeitbestrahlung alle 2 Tage bis zur Ausheilung der mukosalen Defekte erfasst (Abbildung 13). Der maximale Gewichtsverlust beträgt  $\leq 5\%$ . Lediglich in der Gruppe mit der niedrigsten Dosis findet sich ein mittlerer Gewichtsverlust von 6,3 % an Tag 12 nach Bestrahlung. Das Allgemeinbefinden der Tiere ist zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt.

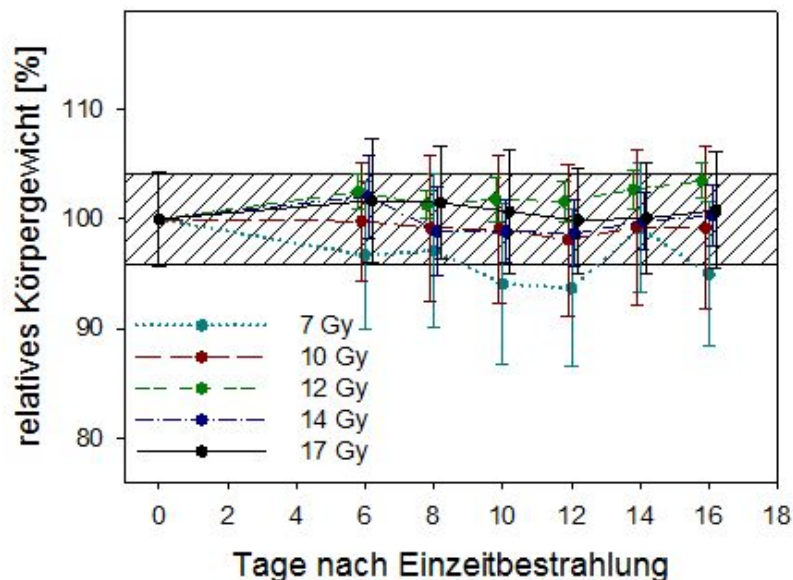


Abbildung 13: Gewichtsverlauf nach alleiniger Einzeitbestrahlung

Die Abbildung zeigt den relativen mittleren Gewichtsverlauf der Tiere im Versuch KE nach Einzeitbestrahlung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Der schraffierte Bereich zeigt die Standardabweichung aller Tiere vor Versuchsbeginn.

## 4.2 Alleinige L-NAME-Applikation

Fünf Tiere wurden ausschließlich mit dem Medikament behandelt. Die Tiere zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Dies wird auch im Gewichtsverlauf deutlich (Abbildung 14). Innerhalb der 25 Tage Beobachtungszeit sind keine Effekte an der Schleimhaut aufgetreten.

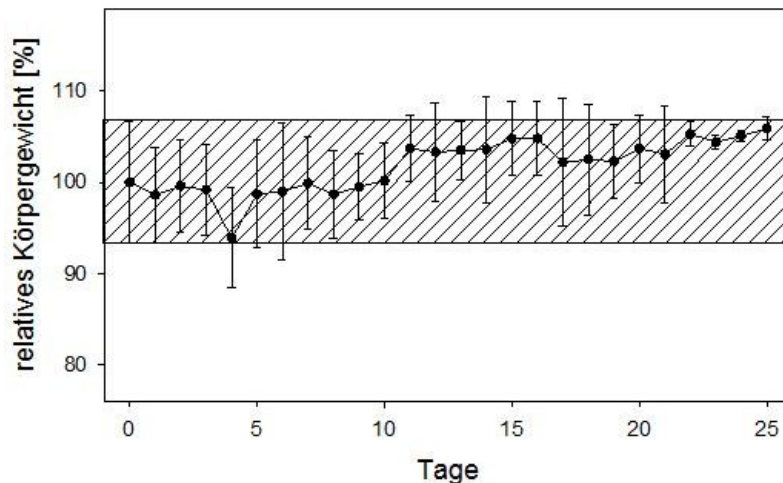


Abbildung 14: Gewichtsverlauf nach alleiniger L-NAME-Applikation

Die Abbildung zeigt den relativen mittleren Gewichtsverlauf der Tiere nach täglicher L-NAME-Applikation von Tag 0 bis 25. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Der schraffierte Bereich zeigt die Standardabweichung aller Tiere vor Versuchsbeginn.

## 4.3 Einfluss von L-NAME bei Einzeitbestrahlung

In den Versuchen E1 und E2 soll der Einfluss von L-NAME auf die Strahlenreaktion des Zungenepithels nach Einzeitbestrahlung untersucht werden. Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Tabelle 7.

Die L-NAME-Applikation wird 3 Tage vor der lokalen Zungenbestrahlung (Einzeitbestrahlung) begonnen und endet im Versuch E1 mit der Diagnose von Ulzera und im Versuch E2 mit einer vollständigen Reepithelisierung des Zungenepithels. Am Bestrahlungstag wird L-NAME jeweils 30 Minuten vor der Bestrahlung intraperitoneal appliziert.

Tabelle 7: Ergebnisse der Einzeitbestrahlung ohne und mit L-NAME-Gabe

	<b>L-NAME<sup>a</sup></b>	<b>ED<sub>50</sub></b> [Gy]	<b><math>\sigma^b</math></b> [Gy]	<b>p<sub>Dosis</sub><sup>c</sup></b>	<b>p<sub>Kontrolle</sub><sup>d</sup></b>	<b>Latenz</b> [Tage]	<b>SD</b> [Tage]	<b>Dauer</b> [Tage]	<b>SD</b> [Tage]
<b>KE</b>		13,6	1,0	0,0013	–	10,6	1,1	3,5	1,0
<b>E1</b>	-3/D	12,1	0,1	$\leq 0,0001^{\S}$	0,0500	11,4	1,2	3,0	0,8
<b>E2</b>	-3/H	14,6	1,8	0,0004	0,3146	11,3	1,5	3,1	1,0

<sup>a</sup> Zeitraum der L-NAME-Gabe (erster/letzter Tag) bezogen auf den Tag der lokalen Zungenbestrahlung (Tag 0); Diagnose (D); vollständige Reepithelisierung (H)

<sup>b</sup> Standardabweichung ( $\sigma$ ) der ED<sub>50</sub>, entsprechend der Probit-Analyse

<sup>c</sup> p-Wert für die Dosisabhängigkeit der Reaktion

<sup>d</sup> p-Wert für den Vergleich mit dem Kontrollversuch

<sup>\S</sup> berechnet mit Alternativmethode (siehe Abschnitt 3.1.5.1)

### 4.3.1 Dosisabhängigkeit der Ulkusinzidenz

Abbildung 15 stellt die ED<sub>50</sub>-Werte von KE und E1 bzw. E2 vergleichend gegenüber. Der ED<sub>50</sub>-Wert liegt im Versuch E1 bei 12,1 Gy (95 % Vertrauensbereich 12,0 bis 12,2 Gy), für E2 bei 14,6 Gy (95 % Vertrauensbereich 13,1 Gy bis 16,2 Gy).

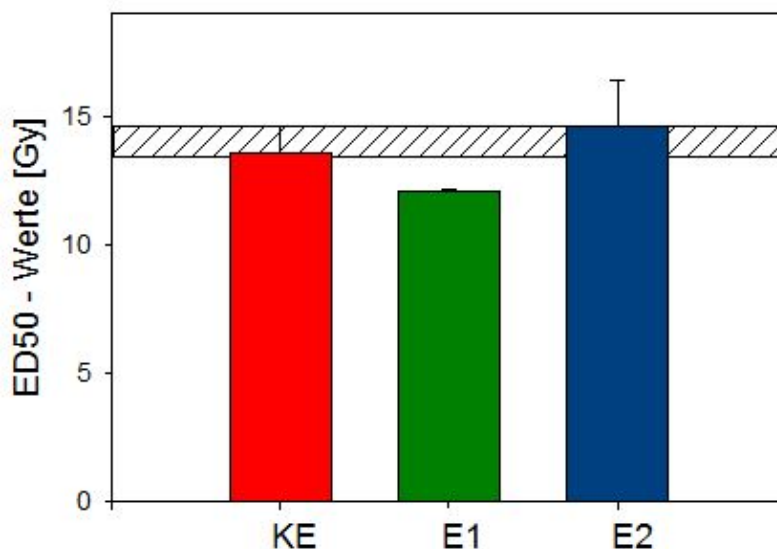


Abbildung 15: Dosisabhängigkeit der Ulkusinzidenz nach lokaler Einzeitbestrahlung

Dargestellt sind die ED<sub>50</sub>-Werte der lokalen Einzeitbestrahlung des Kontrollversuches (KE), L-NAME-Gabe von Tag -3 bis zur Diagnose (E1) bzw. Ausheilung aller makroskopischen Läsionen (E2). Der schraffierte Bereich gibt den ED<sub>50</sub>-Wert  $\pm$  Standardabweichung  $\sigma$  der Bestrahlung ohne L-NAME-Gabe (KE) wieder. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung  $\sigma$  der ED<sub>50</sub>.



### 4.3.2 Zeitlicher Verlauf

Tabelle 7 fasst die zeitlichen Verlaufsdaten der Versuche E1 und E2 im Vergleich zur Einzeitbestrahlung ohne L-NAME-Gabe (KE) zusammen.

Erste Reagenten treten zwischen den Tagen 7 und 9 auf. An den Tagen 11 bis 14 zeigt sich die höchste Prävalenz. Die makroskopische Heilung erfolgt in allen Versuchen bis spätestens Tag 16 (Abb. 16). In den Versuchen mit L-NAME-Applikation zeigt sich kein signifikanter Unterschied von Latenzzeit oder Ulkusdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe (KE).

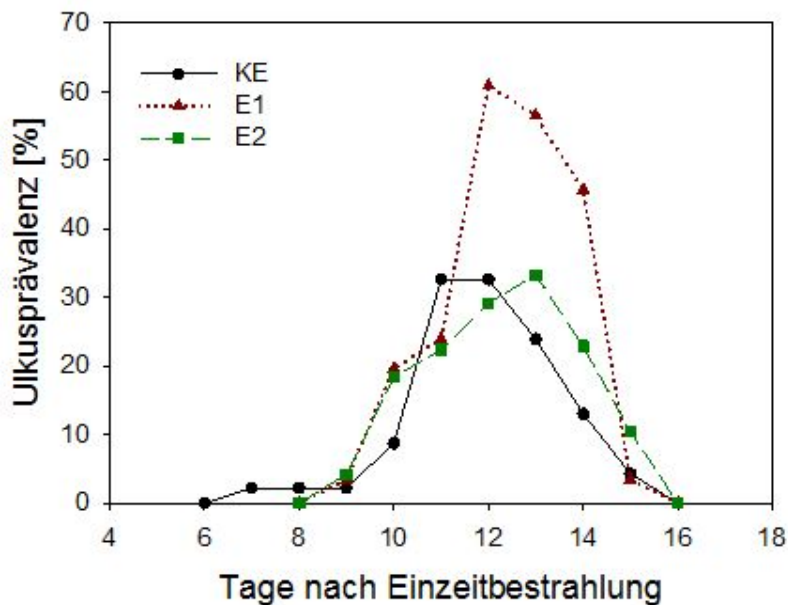


Abbildung 16: Ulkusprävalenz nach lokaler Zungenbestrahlung mit L-NAME-Applikation zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zur alleinigen lokalen Zungenbestrahlung

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Versuche E1 und E2 im Vergleich zur alleinigen lokalen Zungenbestrahlung. Erste Reagenten zeigen sich zwischen den Tagen 7 und 9. Die höchste Prävalenz tritt an den Tagen 11 bis 14 auf, wobei die meisten Reagenten im Versuch E1 (L-Name-Gabe von Tag -3 bis Diagnose) verzeichnet werden. Die Reepithelialisierung erfolgt spätestens am Tag 16.

## 4.4 Einfluss von L-NAME auf das Zungenepithel bei Bestrahlung mit $5 \times 3\text{Gy}/\text{Woche}$

In dieser Versuchsreihe fand eine fünfmalige fraktionierte Bestrahlung mit anschließender lokaler Zungenbestrahlung statt. Das Medikament wurde in unterschiedlichen Zeiträumen appliziert. An den Bestrahlungstagen erfolgte die Applikation 30 Minuten vor Bestrahlung. Die Tabelle 8 fasst die Ergebnisse der Versuche mit L-NAME-Applikation von Tag -3 bis Tag 6 (5F1), Tag -3 bis Erstdiagnose (5F2) und Tag -3 bis Ausheilung der Schleimhautläsionen (5F3) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne L-NAME-Anwendung (K5F) zusammen.

Tabelle 8: Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung ohne und mit L-NAME

	L-NAME <sup>a</sup>	ED <sub>50</sub> [Gy]	$\sigma^b$ [Gy]	pDosis <sup>c</sup>	pKontrolle <sup>d</sup>	Latenz <sup>e</sup> [Tage]	SD [Tage]	Dauer [Tage]	SD [Tage]
<b>K5F</b>		12,3	0,8	0,0038	–	7,5	0,8	3,7	0,6
<b>5F1</b>	-3/6	13,3	1,2	0,0003	0,3245	7,5	3,7	3,0	0,9
<b>5F2</b>	-3/D	12,8	1,0	0,0007	0,4495	10,6	1,1	3,5	1,0
<b>5F3</b>	-3/H	14,7	1,7	0,0005	0,0298	10,6	1,1	3,5	1,0

<sup>a</sup> Zeitraum der L-NAME-Gabe (erster/letzter Tag) bezogen auf den Tag der lokalen Zungenbestrahlung (Tag 0); Diagnose (D); vollständige Reepithelisierung (H)

<sup>b</sup> Standardabweichung ( $\sigma$ ) der ED<sub>50</sub>, entsprechend der Probit-Analyse

<sup>c</sup> p-Wert für die Dosisabhängigkeit der Reaktion

<sup>d</sup> p-Wert für den Vergleich mit dem Kontrollversuch

<sup>e</sup> bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

#### 4.4.1 Dosisabhängigkeit der Ulkushäufigkeit

Alle Dosis-Effekt-Kurven der einwöchig fraktioniert bestrahlten Versuche sind gut definiert (Abbildung 17).

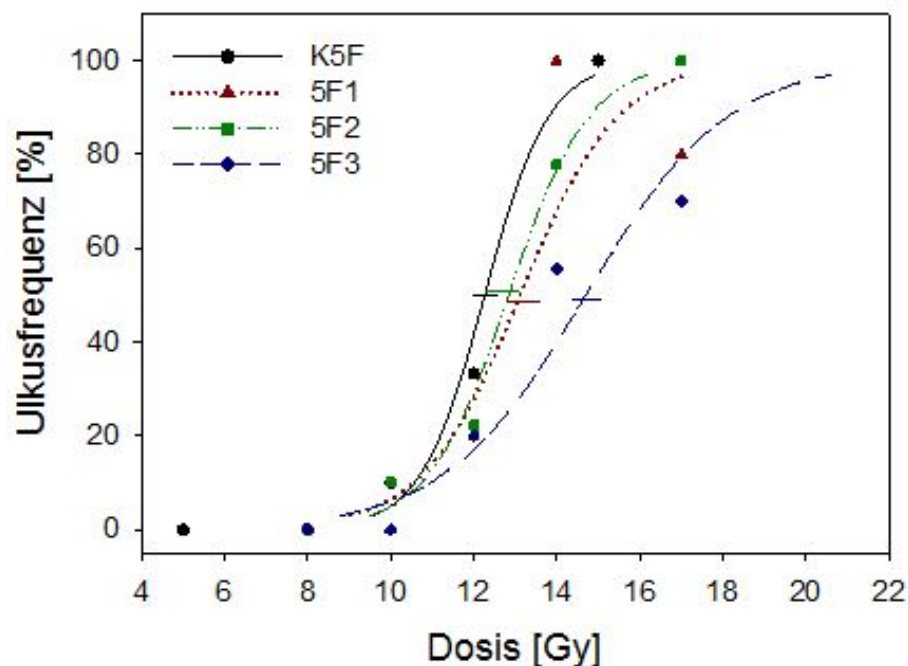


Abbildung 17: Dosis-Effekt-Kurven der einwöchig fraktioniert bestrahlten Versuchsgruppen

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung  $\sigma$  der ED<sub>50</sub>. Die Probit-Analyse ergibt für die Dosisabhängigkeit in allen Fällen p-Werte  $\leq 0,004$ . Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsergebnissen der Kontrollgruppe (K5F) und 5F1 und 5F2. Die Dosis-Effekt-Kurve für 5F3 ist signifikant hin zu höheren Dosen verschoben ( $p=0,0298$ ).



Im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ergibt sich für die L-NAME-Gabe von Tag -3 bis Tag 6 bzw. bis Ulkusdiagnose kein signifikanter Unterschied. Lediglich bei Applikation bis zur Heilung der Reaktion steigt die Strahlentoleranz signifikant an ( $\text{ED}_{50}$  14,7 Gy vs. 12,3 Gy,  $p=0,0298$ ). Der Unterschied in den  $\text{ED}_{50}$ -Werten für die Testbestrahlung beträgt 2,4 Gy, entsprechend einem Dosis-Modifikations-Faktor ( $\text{DMF} = \text{ED}_{50} \text{ mit L-NAME} / \text{ED}_{50} \text{ der Kontrolle}$ ) von 1,2.

#### 4.4.2 Zeitlicher Verlauf

Die ersten Reagenten treten zwischen den Tagen 5 und 7 auf. Die vollständige Ausheilung der Ulzerationen in den Versuchen mit einwöchiger fraktionierter Bestrahlung ist spätestens am Tag 12 erfolgt (Abb. 18). In Bezug auf die Latenzzeit und die Ulkusdauer zeigt sich bei L-NAME-Gabe kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (K5F). Innerhalb der Versuchsreihen mit L-NAME-Applikation zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

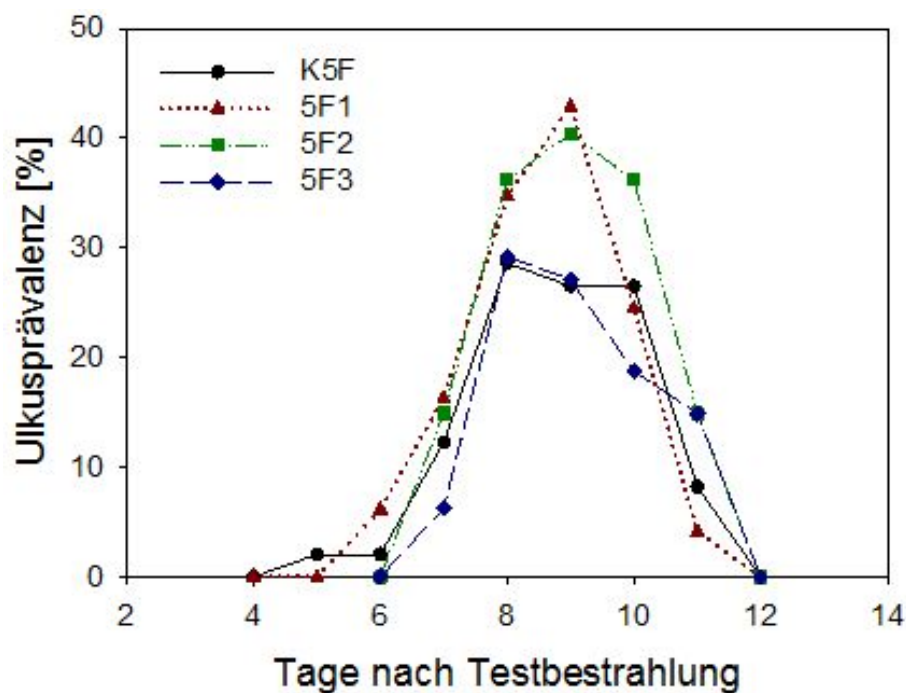


Abbildung 18: Ulkusprävalenz nach einwöchig-fraktionierter perkutaner Schnauzenbestrahlung plus Testbestrahlung

Die Abbildung zeigt die Ulkusprävalenz nach fünfmaliger fraktionierter Schnauzenbestrahlung und anschließender lokaler Zungenbestrahlung mit L-NAME-Applikation von Tag -3 bis Tag 6 (5F1), Tag -3 bis Erstdiagnose (5F2), Tag -3 bis Ausheilung der Schleimhautläsionen (5F3) und ohne L-NAME-Applikation (K5F). In allen Versuchen ist die Ulkusprävalenz zwischen dem 8. und 9. Tag am höchsten.

## 4.5 Einfluss von L-NAME bei Bestrahlung mit $10 \times 3\text{Gy}/2$ Wochen

Es findet eine zweiwöchig fraktionierte Bestrahlung mit anschließender lokaler Zungenbestrahlung statt. Das Medikament wird in unterschiedlichen Zeiträumen appliziert, an den Bestrahlungstagen erfolgt die Gabe 30 Minuten vor Bestrahlung. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung ohne und mit L-NAME

	<b>L-NAME<sup>a</sup></b>	<b>ED<sub>50</sub></b> [Gy]	<b><math>\sigma^b</math></b> [Gy]	<b>pDosis<sup>c</sup></b>	<b>pKontrolle<sup>d</sup></b>	<b>Latenz<sup>e</sup></b> [Tage]	<b>SD</b> [Tage]	<b>Dauer</b> [Tage]	<b>SD</b> [Tage]
<b>K10F</b>		13,0	0,1	$\leq 0,0001^{\S}$	—	8,7	0,5	2,7	1,0
<b>10F1</b>	-3/6	12,9	0,1	$\leq 0,0001^{\S}$	0,1709	8,9	0,7	3,9	0,8
<b>10F2</b>	-3/14	13,0	0,1	$\leq 0,0001^{\S}$	0,6537	8,2	0,7	4,4	0,8
<b>10F3</b>	-3/D	12,0	0,1	$\leq 0,0001^{\S}$	$\frac{0,5059^y}{0,1381}$	8,1	0,6	4,0	0,9
<b>10F4</b>	-3/H	13,8	1,4	0,0006	0,2332	8,3	0,9	4,3	0,9
<b>10F5</b>	7/14	13,1	0,8	0,0065	0,7421	7,6	0,6	3,9	0,7

<sup>a</sup> Zeitraum der L-NAME-Gabe (erster/letzter Tag) bezogen auf den Tag der lokalen Zungenbestrahlung (Tag 0); Diagnose (D); vollständige Reepithelisierung (H)

<sup>b</sup> Standardabweichung ( $\sigma$ ) der ED<sub>50</sub>, entsprechend der Probit-Analyse

<sup>c</sup> p-Wert für die Dosisabhängigkeit der Reaktion

<sup>d</sup> p-Wert für den Vergleich mit dem Kontrollversuch

<sup>e</sup> bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

<sup>§</sup> berechnet mit Alternativmethode (siehe Abschnitt 3.1.5.1)

<sup>y</sup> berechnet nach Mittelwertsmethode für Nichtreagenten/Reagenten (siehe Abschnitt 3.1.5.1)

### 4.5.1 Dosisabhängigkeit

Abbildung 19 zeigt die ED<sub>50</sub>-Werte dieser Versuchsgruppe. Diese variieren zwischen 12,9 Gy und 13,8 Gy, mit Ausnahme des Wertes für den Versuch 10F3 mit L-NAME-Gabe von Tag -3 bis zur Erstdiagnose. Hier liegt die ED<sub>50</sub> bei 12,0 Gy (95 % Vertrauensbereich 11,9 Gy bis 12,1 Gy). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (K10F) ergibt die Maximum-Likelihood-Analyse einen signifikanten Unterschied (p=0,0093).

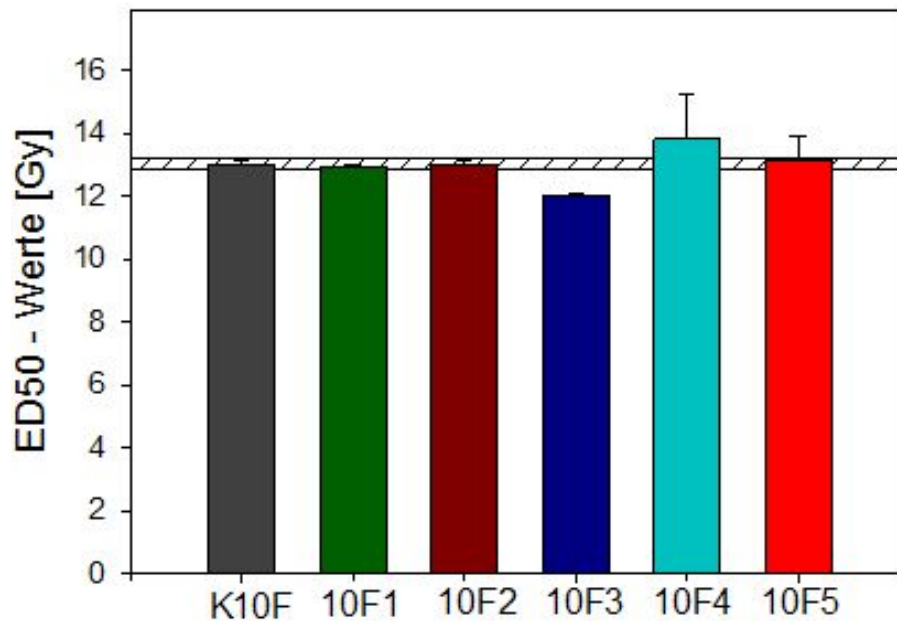


Abbildung 19: ED<sub>50</sub>-Werte nach einwöchiger fraktionierter Bestrahlung plus Testbestrahlung

Dargestellt sind die ED<sub>50</sub>-Werte der Testbestrahlung der Versuchsgruppen mit L-NAME-Applikation von Tag -3/6 (10F1), Tag -3/14 (10F2), Tag -3/Diagnose (10F3), Tag -3/Heilung (10F4) und Tag 7/14 (10F5) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K10F) ohne L-NAME-Applikation nach zweiwöchig fraktionierter Bestrahlung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung  $\sigma$  der ED<sub>50</sub> an. Der schraffierte Bereich gibt den ED<sub>50</sub>-Wert  $\pm$  Standardabweichung  $\sigma$  der Testbestrahlung ohne L-NAME-Gabe wieder.

#### 4.5.2 Zeitlicher Verlauf

Abbildung 20 zeigt die Verlaufsdaten der Versuche für die zweiwöchig fraktionierte Bestrahlung mit L-NAME-Injektion in verschiedenen Zeiträumen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne L-NAME-Anwendung (K10F). Erste Reagenten treten an den Tagen 5 bis 7 auf. Die vollständige makroskopische Ausheilung aller Ulzerationen ist spätestens am Tag 14 erfolgt.

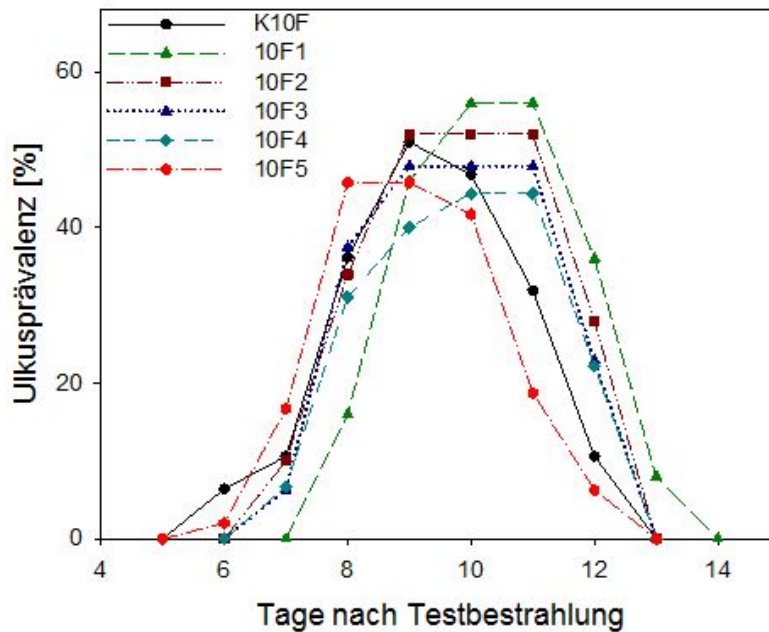


Abbildung 20: Ulkuszinzidenz nach zweiwöchig-fraktionierter perkutaner Schnauzenbestrahlung

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf nach fraktionierter Bestrahlung und anschließender lokaler Zungenbestrahlung ohne (K10F) bzw. mit L-NAME-Applikation in unterschiedlichen Zeiträumen (Tag -3/6: 10F1; Tag -3/14: 10F2; Tag -3/Diagnose: 10F3; Tag -3/Heilung: 10F4; Tag 7/14: 10F5). Die höchste Ulkusprävalenz zeigt sich in allen Versuchen zwischen dem 8. und 12. Tag.

## 4.6 Histologische Untersuchungen

### 4.6.1 Morphologische Veränderungen

Die Histologie des unbehandelten Epithels wurde bereits in Kapitel 2.6.5 beschrieben. In den eigenen Untersuchungen ergeben sich keine Abweichungen. In Folge der Bestrahlung ist bereits in der Mitte der ersten Bestrahlungswoche ein deutlicher Zellverlust zu verzeichnen. Insgesamt zeigt sich vor allem die Germinativschicht dünner. Nach einer Woche fraktionierte Bestrahlung ( $5 \times 3$  Gy) finden sich im Stratum basale vorwiegend vergrößerte Zellkerne. Desweiteren sind Karyopyknose und Karyorrhesis nachzuweisen. Das Stratum superficiale scheint aufgelockert. Nach der Bestrahlung, von Tag 15 bis 20, ist in allen Epithelschichten eine Hyperplasie nachzuweisen. Am Ende der Nachbeobachtungszeit ist die Restauration des Epithels abgeschlossen. In der L-NAME behandelten Tiergruppe sind histomorphologisch keine deutlichen Abweichungen zum ausschließlich bestrahlten Epithel zu erkennen.

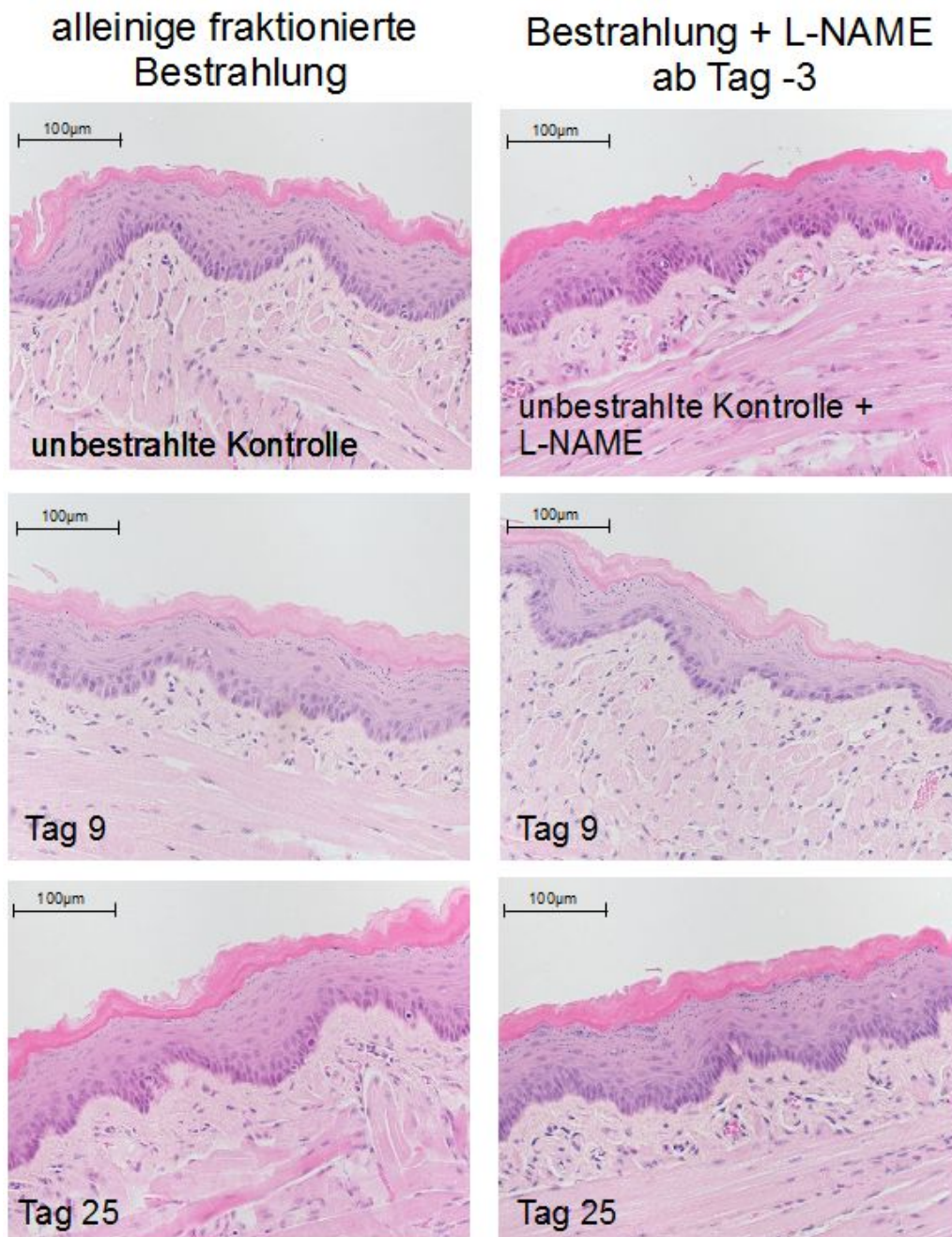


Abbildung 21: Vergleich der Mukosa bei alleiniger fraktionierter Bestrahlung und nach Applikation von L-NAME zu verschiedenen Zeitpunkten der Nachbeobachtungsphase

In der linken Spalte sind die histologischen Bilder bei alleiniger fraktionierter Bestrahlung ( $10 \times 3$  Gy/2 Wochen) dargestellt. In der rechten Spalte befinden sich die Bilder der Bestrahlung mit L-NAME-Applikation (Tag -3 bis 25). Bereits innerhalb der ersten Bestrahlungswoche ist ein deutlicher Zellverlust in allen Epithelschichten zu verzeichnen. Am Ende der Nachbeobachtungszeit ist die Restauration des Epithels erkennbar.

## 4.6.2 Quantitative Analysen

### 4.6.2.1 Unbestrahltes, unbehandeltes Zungenepithel

Im Schleimhautepithel der Zungenunterseite der Maus des Stammes C3H/Neu beträgt die **mittlere Zelldichte**  $360 \pm 19$  (MW  $\pm$  SEM) Zellen/Millimeter Epithellänge (Tabelle 10). Die Germinativschicht beinhaltet 72 % der kernhaltigen Zellen ( $258 \pm 14$  Zellen/mm). Die restlichen 28% ( $102 \pm 6$  Zellen/mm) befinden sich in der funktionellen Schicht.

Die **Epitheldicke** beträgt im Mittel  $80,4 \pm 3,2$   $\mu\text{m}$  (MW  $\pm$  SEM). Hiervon nimmt die Germinativschicht 24 % ( $19,4 \pm 0,7$   $\mu\text{m}$ ), die Funktionsschicht 56 % ( $45 \pm 2,3$   $\mu\text{m}$ ) und die Keratinschicht die restlichen 20 % ( $16 \pm 1,6$   $\mu\text{m}$ ) ein.

Tabelle 10: Charakteristika des unbestrahlten Zungenepithels

	Zellzahlen ( $\pm$ SEM)	%	Dicke ( $\pm$ SEM) $\mu\text{m}$	%
Germinativschicht	258 ( $\pm 14$ )	72	19,4( $\pm 0,7$ )	24
funktionelle Schicht	102 ( $\pm 6$ )	28	45 ( $\pm 2,3$ )	56
Keratinschicht	–	–	16( $\pm 1,6$ )	20
Gesamtepithel	360( $\pm 19$ )	100	80,4( $\pm 3,2$ )	100

### 4.6.2.2 Bestrahlung mit $10 \times 3$ Gy/2 Wochen; Wirkung von L-NAME Zellzahlen

In den Versuchen H0 und H1 wird die Zellzahl und die Epitheldicke der Zungenschleimhaut unter fraktionierter Bestrahlung mit  $5 \times 3$  Gy/Woche über 2 Wochen (Tag 0-4, 7-11) bestimmt. Zungenentnahmen erfolgen bis Tag 25. Die Tiere des Versuches H1 erhalten täglich L-NAME von Tag -3 vor Bestrahlungsbeginn bis zum Tag vor der Tötung. Die Zungenentnahme von je 5 Tieren erfolgt täglich um 10:00 Uhr, an den Entnahmetagen findet keine Bestrahlung statt.

In Abbildung 22 sind die Veränderungen der Zellzahl illustriert. Eine Übersicht der Einzelwerte gibt Tabelle 11. Detaillierte Angaben sind in den Tabellen 13 und 14 im Anhang gelistet.



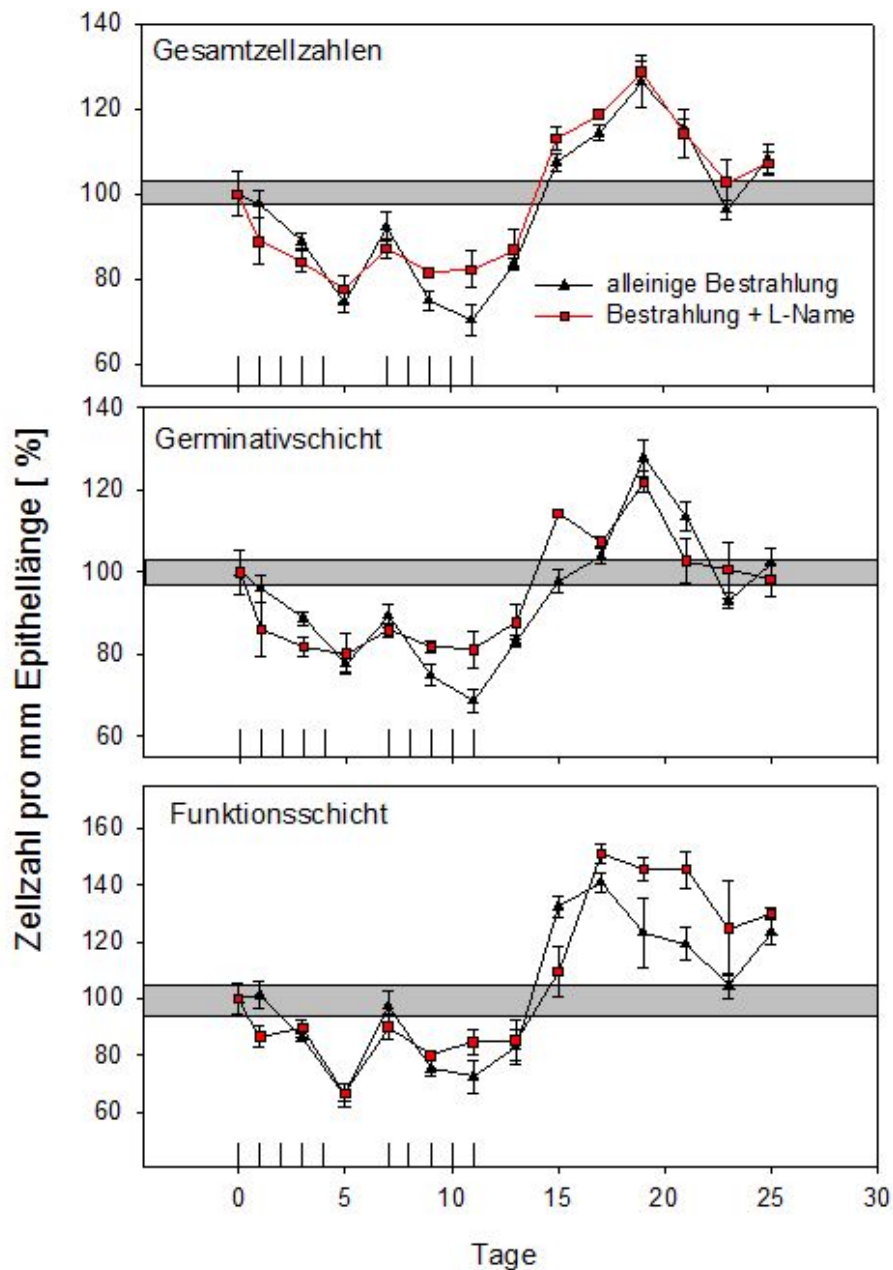


Abbildung 22: Zellzahlen der Schleimhautschichten unter  $5 \times 3$  Gy/Woche über 2 Wochen und in den folgenden Nachbeobachtungstagen

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Zellzahlen im gesamten Epithel (obere Abb.), der Germinativschicht (mittlere Abb.) und der Funktionsschicht (untere Abb.). Die Werte zeigen den Mittelwert von je 5 Tieren pro Entnahmetag. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll ist über den Abszissen illustriert (| entspricht einer Fraktion von 3 Gy).

Tabelle 11: Veränderung der absoluten und relativen Zellzahlen (Gesamtepithel) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen

	alleinige fraktionierte Bestrahlung (H0)		Bestrahlung + L-NAME ab Tag -3 (H1)	
Tag	Zellzahl/mm ( $\pm$ SEM) [mm]	Zellzahl/mm ( $\pm$ SEM) [%]	Zellzahl/mm ( $\pm$ SEM) [mm]	Zellzahl/mm ( $\pm$ SEM) [%]
0	360( $\pm$ 19)	100 ( $\pm$ 5)	360( $\pm$ 19)	100( $\pm$ 5)
1	352( $\pm$ 12)	98( $\pm$ 3)	320( $\pm$ 20)	89( $\pm$ 6)
3	321( $\pm$ 6)	89( $\pm$ 2)	303( $\pm$ 9)	84( $\pm$ 5)
5	269( $\pm$ 9)	74( $\pm$ 3)	279( $\pm$ 11)	77( $\pm$ 3)
7	332( $\pm$ 12)	92( $\pm$ 3)	314( $\pm$ 8)	87( $\pm$ 2)
9	270( $\pm$ 8)	75( $\pm$ 2)	294( $\pm$ 4)	82( $\pm$ 1)
11	254( $\pm$ 13)	70( $\pm$ 4)	296( $\pm$ 15)	82( $\pm$ 4)
13	301( $\pm$ 4)	84( $\pm$ 1)	313( $\pm$ 18)	87( $\pm$ 5)
15	387( $\pm$ 8)	107( $\pm$ 2)	407( $\pm$ 10)	113( $\pm$ 3)
17	412( $\pm$ 7)	114( $\pm$ 2)	428( $\pm$ 3)	119( $\pm$ 1)
19	456( $\pm$ 22)	126( $\pm$ 6)	464( $\pm$ 10)	129( $\pm$ 3)
21	416( $\pm$ 8)	115( $\pm$ 2)	412( $\pm$ 21)	114( $\pm$ 6)
23	347( $\pm$ 5)	96( $\pm$ 2)	371( $\pm$ 19)	103( $\pm$ 5)
25	390( $\pm$ 12)	108( $\pm$ 3)	386( $\pm$ 10)	107( $\pm$ 3)

Bei der *alleinigen perkutanen Schnauzenbestrahlung (H0)* nimmt die Zellzahl ab dem Bestrahlungsbeginn kontinuierlich bis zu einem Minimum am Ende der ersten Bestrahlungswoche ab. Am Tag 5 findet sich mit 74 % ein erster Minimalwert der Zellzahlen. Am bestrahlungsfreien Wochenende kommt es zu einem leichten Anstieg der Zellzahlen, mit nachfolgender erneuter Reduktion im Verlauf der zweiten Bestrahlungswoche. Am Ende der zweiten Bestrahlungswoche (Tag 11) ist die Zellzahl unwesentlich unter den Wert am Ende der ersten Bestrahlungswoche gefallen (70 %). In den folgenden Nachbeobachtungstagen führen Regenerationsvorgänge zu einem Wiederanstieg der Zellzahlen. Das Maximum ist 8 Tage nach Bestrahlungsende (Tag 19) erreicht. Es finden sich 26 % mehr Zellen pro mm Epithellänge als im Kontrollepithel. Bis zum Ende der Untersuchungen kehren die Werte auf das Ausgangsniveau zurück. Die Veränderungen der Zellzahlen im Gesamtepithel spiegeln sich in den einzelnen Kompartimenten wieder (Abb. 22).

In Versuch *H1 mit L-NAME-Gabe* verhalten sich die Zellzahlen ähnlich zu denjenigen unter alleiniger Bestrahlung. Ein Minimum von 77 % wird am Tag 5 erreicht. Dabei beginnt die Abnahme gegenüber alleiniger Bestrahlung etwas später. In der zweiten Bestrahlungswoche liegen die Zellzahlen bei L-NAME-Gabe systematisch über denjenigen der alleinigen Bestrahlung, was bevorzugt auf die Germinativschicht zurückzuführen ist. Die Restauration der Zellzahlen im Anschluss an die Bestrahlung ist unter Medikamentengabe geringfügig beschleunigt. Das Maximum ist wie in Versuch H0 an dem Tag 19 nach Bestrahlungsbeginn erreicht. Im Vergleich zum Aus-



gangsniveau sind 29 % mehr Zellen im Gesamtepithel vorhanden, wobei Zellen der funktionellen Schicht auf 145 % angestiegen sind. Bis zum Ende der Untersuchungen bleiben vor allem die Werte in der Funktionsschicht erhöht.

### Epitheldicke

Die Veränderungen der relativen Epitheldicke, bezogen auf die Dicke in unbehandelten, unbestrahlten Tieren, illustriert die Abbildung 23. In Tabelle 12 sind die Veränderungen der absoluten und relativen Epitheldicke (D) im Einzelnen zusammengefasst. In den Tabellen 15 und 16 im Anhang befindet sich die detaillierte Auflistung.

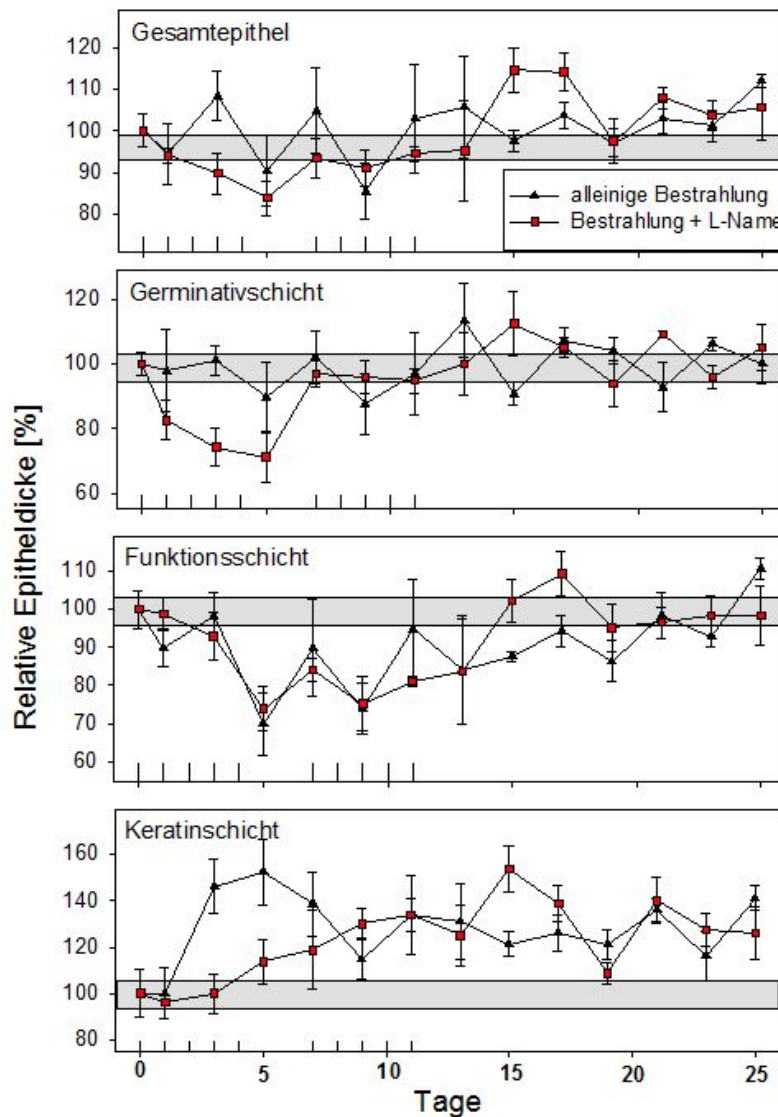


Abbildung 23: Epitheldicke der einzelnen Schichten unter  $5 \times 3$  Gy/Woche über 2 Wochen fraktionierter Bestrahlung und den Nachbeobachtungstagen. Dargestellt sind die Veränderungen der Epitheldicke des Gesamtepithels (oben), der Germinativschicht, der funktionellen Schicht und der Keratinschicht (unten) unter Bestrahlung mit  $10 \times 3$  Gy/2 Wochen. Die Normalwerte des unbehandelten Epithels sind als schraffierte Bereiche dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren  $MW \pm SEM$  ( $n=5$ ). Das Bestrahlungsprotokoll ist über den Abszissen illustriert (| entspricht einer Fraktion von 3 Gy).

Tabelle 12: Veränderung der absoluten und relativen Gesamtepitheldicke während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen

	alleinige fraktionierte Bestrahlung (H0)		Bestrahlung + L-NAME ab Tag -3 (H1)	
Tag	MW <sup>a</sup> ±SEM [μm]	MW <sup>a</sup> ±SEM [%]	MW <sup>a</sup> ±SEM [μm]	MW <sup>a</sup> ±SEM [%]
0	80(±3)	100(±4)	80(±3)	100(±4)
1	76(±6)	95(±7)	76(±1)	94(±2)
3	87(±5)	108(±6)	72(±4)	90(±5)
5	73(±7)	90(±8)	67(±3)	84(±4)
7	84(±8)	105(±10)	75(±4)	94(±5)
9	69(±5)	85(±7)	73(±4)	91(±4)
11	83(±10)	103(±13)	76(±1)	95(±2)
13	85(±10)	106(±12)	77(±10)	95(±12)
15	79(±2)	98(±3)	92(±4)	115(±5)
17	83(±3)	104(±3)	92(±4)	114(±5)
19	78(±3)	97(±3)	78(±4)	98(±5)
21	83(±3)	103(±4)	87(±2)	108(±3)
23	81(±3)	101(±4)	83(±3)	104(±4)
25	90(±1)	112(±2)	85(±6)	106(±8)

<sup>a</sup> Mittelwert der Gesamtepitheldicke

Bei alleiniger fraktionierter Bestrahlung steigt die **Gesamtdicke** des Epithels im Laufe der ersten Bestrahlungstage an [Tag 3: 108(±6) %] und fällt bis Tag 5 auf ein leicht subnormales Niveau. Im weiteren Verlauf sind die Werte normal bis geringfügig erhöht (97-106 %). In dem Versuch mit L-NAME-Applikation nimmt die Epitheldicke während der ersten Woche der Behandlung stetig ab. Das Minimum wird an dem Tag 5 mit 84 %(±4) im Vergleich zum Ausgangsniveau erreicht. Anschließend steigen die Werte wieder auf ein normales bis supranormales Niveau an, finden sich dabei aber häufig über denjenigen der alleinigen Bestrahlung.

Die Dicke der **Germinativschicht** bleibt unter alleiniger Bestrahlung auf Ausgangsniveau. Dagegen fallen die Werte unter zusätzlicher L-NAME-Gabe in der ersten Bestrahlungswoche deutlich ab [Tag 5: 71(±8) %].

Die **Funktionsschicht** zeigt in beiden Versuchen innerhalb der ersten Bestrahlungswoche eine stetige Abnahme bis zum Tag 5. Im weiteren Verlauf nimmt die Dicke wieder langsam zu, bleibt jedoch bei den unbehandelten Tieren bis zum Tag 21 unter Normalwerten. Die funktionelle Schicht der behandelten Versuchsgruppe erreicht im Gegensatz dazu Normalwerte bereits am 11.-15. Tag.

Unter alleiniger Bestrahlung nimmt die Dicke der **Keratinschicht** im Laufe der ersten Woche deutlich zu und bleibt während des gesamten Untersuchungszeitrau-

---

mes über dem Ausgangswert. Unter L-NAME-Gabe unterbleibt die Zunahme in der ersten Woche, dann verlaufen die Werte gleichsinnig.

## 5. Diskussion

### 5.1 Klinischer Hintergrund

Nach aktuellsten Schätzungen des Robert-Koch-Instituts, Berlin, werden im Jahr 2014 in Deutschland 9900 Männer und 3900 Frauen neu mit einer Krebserkrankung der Mundhöhle diagnostiziert (RKI 2014). Eine ähnlich hohe Neuerkrankungsrate kann auch für Haustiere angenommen werden (KELSEY et al. 1998). Therapeutisch ist neben chirurgischen und chemotherapeutischen Behandlungsansätzen die Strahlentherapie eine sehr effektive Behandlungsform. In der Humanmedizin erhält die Hälfte bis zwei Drittel der Tumor-Patienten eine oder mehrere Strahlentherapien im Verlauf der Erkrankung (BECKMANN 2012, WIKIMEDIA 2014). Zunehmend etabliert sich die Radiotherapie auch in der Tiermedizin (siehe Abschnitt 2.3.2).

Durch die ionisierende Strahlung soll das Tumorgewebe vernichtet werden. Normalgewebe erhalten hierbei unausweichlich ebenfalls signifikante Strahlendosen. Hierzu zählen normale Strukturen innerhalb des Tumors (Gefäße, Bindegewebe), in den Randgebieten um die Neoplasie herum, in denen eine mikroskopische Infiltration vermutet wird, sowie das Gewebe in den Ein- bzw. Austrittskanälen der Strahlung. Die Konsequenz dieser Exposition von gesunden Geweben sind frühe und späte Strahlenfolgen (DÖRR und HERRMANN 2009, HERRMANN et al. 2006a, DÖRR 2006b, DÖRR 2009a). Zu den bedeutenden und dosislimitierenden frühen Strahlenreaktionen im Kopf-Hals-Bereich zählt die orale Mukositis. Diese ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

### 5.2 Bedeutung der radiogenen Mucositis enoralis

Eine häufige und bedeutende frühe Strahlenfolge bei der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren ist die radiogene Mucositis enoralis (siehe Abschnitt 2.7). Obwohl bei den Tierbesitzern häufig der Wunsch nach Lebensverlängerung bzw. Heilung der Pati-

enten besteht, ist die Erhaltung der Lebensqualität die häufigste Indikation für eine Radiotherapie beim Tier. In diesen Fällen sollten auch mildere Formen der oralen Mukositis möglichst gering ausgeprägt sein.

Die ersten Symptome der radiogenen oralen Mukositis zeigen sich bei kurativen veterinärmedizinischen Bestrahlungsprotokollen im Laufe der zweiten Woche. Der stärkste Ausprägungsgrad wird ab der 3. bis 4. Woche der Therapie erreicht (LARUE und GILLETTE 2007, GILLETTE und LARUE 1995, COLLEN und MAYER 2008) und manifestiert sich als ulzerative, hämorrhagische und/oder nekrotisierende Mukositis (COLLEN und MAYER 2008). Jedoch führen bereits frühe inflammatorische Veränderungen zu diffusen Schmerzen im Mund- und Rachenbereich. Reduzierte Futteraufnahme und Gewichtsverlust, aber auch lokale und systemische Infektionen sind die Folgen. Mit der Schwere der frühen Strahlenfolgen steigt zudem auch das Risiko späterer Erkrankungen in der Mundhöhle (consequential late effects) (DÖRR 2009c). Weiterhin erhöhen sich die Kosten der Behandlung in Folge der Schleimhautreaktion (Schmerzmedikation, Antibiose, parenterale Ernährung). Starke Nebenwirkungen führen zudem häufig zu Bestrahlungspausen. Dadurch verschlechtern sich die Tumorheilungsaussichten signifikant (HERRMANN et al. 2006a, DÖRR et al. 2007, DÖRR et al. 2008, DÖRR et al. 2010).

Eine Reihe von supportiven Maßnahmen zur symptomatischen Behandlung der Mukositis haben vor allem in der Humanmedizin Einzug in den klinischen Alltag gefunden (verbesserte Mundhygiene, bei Bedarf Schmerz- und antibiotische Behandlung, Vermeidung von Gewichtsverlust). Jedoch fehlen derzeit biologisch begründete Konzepte zur Prophylaxe oder Therapie der radiogenen Mucositis enoralis in der Human- wie auch in der Tiermedizin.

## 5.3 Molekulare Grundlagen der radiogenen Mucositis enoralis

Die Bestrahlung der Mundschleimhaut führt vordergründig zu einer Gewebshypoplasie infolge der Beeinträchtigung der Zellproduktion in der Germinativschicht bei fortbestehenden Zellverlust, welche sich bis hin zu ulzerativen Läsionen entwickeln kann. Die Strahlenreaktion ist jedoch nicht auf die Epithelzellen beschränkt, sondern bezieht in komplexer Weise Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen (Makrophagen) ein (DÖRR et al. 2007, DÖRR 2009a). Die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) in mesenchymalen Zellen, wie Endothelzellen der Gefäße und deren Media, aber auch in Makrophagen wird beobachtet (DÖRR 2009a). Makrophagen werden aktiviert und produzieren in der Folge u.a. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Weiterhin wurde eine Gefäßdilatation nachgewiesen (JAAL et al. 2010).

Sauerstoffradikale (ROS = reactive oxygen species) und Stickstoffmonoxid führen zu Veränderungen in allen beteiligten Zellpopulationen. ROS aktivieren eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, u.a. NF- $\kappa$ B (SONIS 2011). Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist auch durch proinflammatorische Zytokine möglich. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt ebenfalls zur Transkription des iNOS-Gens und der daraus folgenden Synthese der iNOS (siehe Abschnitt 2.8.3). Hiermit gehen hohe NO-Konzentrationen einher. Stickstoff-Monoxid (NO) führt in hohen Konzentrationen wiederum zu einer Verminderung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (COLASANTI und SUZUKI 2000). NO ist somit möglicherweise als parakrines Messengermolekül an den komplexen Veränderungen der Signaltransduktion bei der Entstehung, Manifestation und Heilung der radiogenen Mucositis enoralis beteiligt.

Aus diesen Betrachtungen ergibt sich die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegende Frage, inwieweit eine Unterdrückung der (i)NOS und eine damit verbundene Inhibition der NO-Produktion Einfluss auf die radiogene Schleimhautreaktion hat.

## 5.4 Tiermodell der Zungenunterseite der Maus

Das Zungenepithel der Maus ist ein etabliertes Tiermodell für strahlenbiologische Untersuchungen zur oralen Mukositis. Die Zungenunterseite ist für die Beurteilung leicht zugänglich. Die Belastung der Tiere während der Untersuchungen ist gering bis maximal mäßig, was sich aus den fehlenden Gewichtsverlusten ableiten lässt (siehe 4.1.4). Die Tiere zeigen zu keinem Zeitpunkt Schmerzsymptomatik. Während der gesamten Untersuchungszeit ist der Allgemeinzustand ausgezeichnet. Das Areal, in welchem die Schleimhautreaktion induziert wird, ist auf ein kleines Feld (3·3 mm<sup>2</sup>) der mechanisch kaum beanspruchten Zungenunterseite beschränkt; dies trägt zur Minimierung der Belastung der Tiere bei. Zudem handelt es sich bei den strahleninduzierten Ulzerationen um einen von einer Pseudomembran bedeckten und nicht um einen offenen Defekt.

Die Untersuchungen finden an Mäusen des Wildtyp-Inzuchtstammes C3H/Neu statt. Durch die Wahl des Tierstammes ist die Vergleichbarkeit mit früheren Untersuchungen gegeben. Geschlechtsabhängige Unterschiede in Bezug auf die strahleninduzierte Mukositis konnten in früheren Studien nicht festgestellt werden (DÖRR et al. 2000). Somit konnten sowohl männliche als auch weibliche Tiere für die Untersuchungen eingesetzt werden. Die fraktionierte Bestrahlung erfolgt als perkutane Bestrahlung der gesamten Schnauze der Tiere. Hierfür ist keine Narkose notwendig. Die für die lokale Bestrahlung erforderlichen Narkosen haben keinen Einfluß auf die Strahlenreaktion (DÖRR 1987, DÖRR 1997).

Die qualitative Übertragung der Ergebnisse auf andere Spezies, wie Mensch, Hund oder Katze, ist prinzipiell möglich. Der histologische Aufbau des Epithels ist in den genannten Spezies grundsätzlich vergleichbar (siehe Abschnitt 2.6). Zellkinetische Parameter, Proliferationsverhalten und die Qualität der Strahlenreaktion sind bei

Mensch und Maus vergleichbar (DÖRR et al. 1994). Die Ergebnisse aus dem Tierversuch sind somit zumindest qualitativ auf die human- und veterinärmedizinischen Patienten übertragbar. Eine Validierung in klinischen Studien ist aber empfehlenswert.

Der Vergleich der Untersuchungen verschiedener Experimentatoren am gleichen Tiermodell (Maus, Tierstamm CH3/Neu) ergibt keine relevanten Unterschiede bezüglich der Dosisabhängigkeit der Inzidenz von Schleimhautulzerationen (NICKSTADT 2000). Die ED<sub>50</sub>-Werte für die ulzerativen Läsionen sind gut reproduzierbar. Demgegenüber zeigen die zeitlichen Verlaufparameter (Ulkusdauer und Latenzzeit) etwas größere Schwankungen zwischen den einzelnen Untersuchern. In der vorliegenden Arbeit fanden alle Untersuchungen ausschließlich durch die Autorin statt, so dass sich subjektive Einflüsse bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Strahlenreaktion lediglich als systematischer Fehler finden könnten.

Der in der vorliegenden Arbeit festgestellte ED<sub>50</sub>-Wert der alleinigen Einzeitbestrahlung beträgt 13,6 ( $\pm 1,0$ ) Gy und entspricht annähernd den Ergebnissen früherer Untersuchungen am gleichen Tiermodell (DÖRR 1997, DÖRR et al. 2002, PABST et al. 2004, STURM 2007). Die Latenzzeit beträgt 10,6 ( $\pm 1,1$ ) Tage, die mittlere Ulkusdauer beträgt 3,5 ( $\pm 1,0$ ) Tage. Diese Ergebnisse entsprechen ebenfalls früheren Untersuchungen.

Die ED<sub>50</sub>-Werte für die Testbestrahlung nach alleiniger fraktionierter Bestrahlung mit  $5 \times 3$  Gy ( $12,3 \pm 0,8$  Gy) und  $10 \times 3$  Gy ( $13,0 \pm 0,1$  Gy) sind im Gegensatz zur Einzeitbestrahlung ( $13,6 \pm 1,0$  Gy) nur geringfügig vermindert. Somit hat die fraktionierte Dosis offensichtlich keinen sehr ausgeprägten Effekt. In früheren Untersuchungen am gleichen Tiermodell wurde dagegen eine deutlichere Verringerung nachgewiesen (DÖRR 1997, DÖRR et al. 2002). Es ist möglich, dass gegenüber früheren Untersuchungen ausgeprägtere Repopulierungsvorgänge stattgefunden haben (z.B. durch geänderte Haltungsbedingungen). Eine weitere Erklärung könnte die undeutliche Abgrenzung des lokalen Testfeldes nach Schnauzenbestrahlung sein, was zu einer schlechteren Ulkus-Erkennbarkeit führt. Dies schränkt natürlich die Aussagekraft der Vergleiche der fraktionierten Bestrahlung ohne/mit Substanzapplikation keineswegs ein, da es sich um eine systematische Abweichung handeln würde.

Die Latenzzeit bis zum Auftreten von Schleimhautreaktionen, bezogen auf den Tag der Testbestrahlung, ist in den fraktionierten Untersuchungen im Vergleich zur Einzeitbestrahlung ( $10,6 \pm 1,1$  Tage) verkürzt, bei einwöchiger fraktionierter auf 7,5 ( $\pm 0,8$ ) Tage, bei zweiwöchiger fraktionierter Bestrahlung auf 8,7 ( $\pm 0,5$ ) Tage. Ursächlich ist hierfür der bereits vor Testbestrahlung eintretende Zellverlust während der fraktionierten Bestrahlung. Es wird im Anschluss an die Testbestrahlung weniger Zeit bis zum Erreichen des kompletten Zellverlustes, d.h. bis zur Ulzeration,

benötigt.

Die durchschnittliche Gesamtzellzahl im unbehandelten Epithel beträgt in der vorliegenden Arbeit  $360 \pm 19$  Zellen/mm Epithellänge. In der Germinativschicht befinden sich 72 % der gesamten Zellzahl ( $258 \pm 14$  Zellen/mm Epithellänge). DÖRR (1987) bestimmt ca. 400 Zellen pro mm Epithellänge, wobei sich 75 % in der Germinativschicht befanden. DÖRR und KUMMERMEHR (1991) ermittelten  $430 \pm 12$  Zellen/mm Epithellänge des selben Mäusestammes, wobei hier 71 % in der Germinativschicht lokalisiert waren. FEHRMANN (2009) untersuchte ebenfalls die Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus CH3/Neu und fand  $578 \pm 5$  Zellen pro mm Epithellänge. Anteilig sind hier ebenfalls 75 % in der Germinativschicht vertreten. Die Zellzahlen wurden zwar alle an Tieren des gleichen Mäusestammes ermittelt, jedoch lagen zum Teil unterschiedliche Haltungsbedingungen und Diäten vor. Unterschiede in der Futterzusammensetzung und Strukturierung, sowie den allgemeinen Haltungsbedingungen könnten zu einer verschiedenen starken mechanischen Beanspruchung der Mundschleimhaut geführt haben. Das würde zu abweichenden Zellzahlen und möglicherweise auch zu Unterschieden in der Repopulierungskinetik führen. Weiterhin wurde die Zellzahlzählung durch unterschiedliche Untersucher durchgeführt. Die Beurteilung von peripher-angeschnittenen Zellkernen ist vom Untersucher abhängig. Trotz variierender Zellzahlen des Gesamtepithels in den einzelnen Untersuchungen wird deutlich, dass sich in allen Untersuchungen über Zweidrittel aller Zellen in der Germinativschicht befinden. Die Autorin der vorliegenden Arbeit führte alle Untersuchungen selbst durch, um subjektive Einflüsse auszuschließen. Bei alleiniger Bestrahlung sinken die Zellzahlen innerhalb der ersten Behandlungswoche auf ca. 70 %. Das entspricht früheren Untersuchungen (FEHRMANN 2009, DÖRR und KUMMERMEHR 1990). Die Ursache hierfür ist die strahlenbedingte Proliferationshemmung. Nach Ende der Bestrahlung erholen sich die Zellzahlen rasch, was ebenfalls bereits so beschrieben wurde (HACKBARTH 2010, FEHRMANN 2009, DÖRR 1997).

## 5.5 Einfluss von L-NAME auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut (Maus)

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals der Einfluss von L-NAME auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut untersucht. Da in der Literatur kaum vergleichbare Untersuchungen zu finden sind, muss sich die Diskussion im Wesentlichen auf eine vergleichende Darstellung der eigenen Ergebnisse und die sich daraus ergebenden Schlußfolgerungen beschränken.



### 5.5.1 Strahlenempfindlichkeit und zeitlicher Verlauf

Bei Einzeitbestrahlung kann keine signifikante Veränderung der Parameter der Strahlenreaktion (isoeffektive Dosis bzw. zeitlicher Verlauf) ermittelt werden. Der in der vorliegenden Arbeit festgestellte ED<sub>50</sub>-Wert der alleinigen Einzeitbestrahlung beträgt 13,6 ( $\pm 1,0$ ) Gy, mit einer Latenzzeit von 10,6 ( $\pm 1,1$ ) Tagen und einer mittleren Ulkusdauer von 3,5 ( $\pm 1,0$ ) Tagen. Die Ergebnisse entsprechen früheren Untersuchungen am gleichen Tiermodell (DÖRR 1997, DÖRR et al. 2002, PABST et al. 2004, STURM 2007). Die L-NAME-Gabe in Verbindung mit einer einwöchig fraktionierten Bestrahlung führt lediglich im Behandlungsprotokoll mit L-NAME-Applikation von Tag -3 bis zur Ausheilung der Ulzerationen zu einer signifikant erhöhten Strahlentoleranz. Die Latenzzeit und die Ulkusinzidenz sind im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung unverändert. Die Ursache für die erhöhte Strahlentoleranz kann nicht abschließend geklärt werden. Auch bei der zweiwöchig fraktionierten Bestrahlung kann kein signifikanter Einfluss von L-NAME auf die Schleimhautreaktion nachgewiesen werden; Ulkusinzidenz und Latenzzeit entsprechen den Ergebnissen der alleinigen fraktionierten Bestrahlung.

### 5.5.2 Histologische Veränderungen

Für die L-NAME-Gabe konnten gegenüber der alleinigen Bestrahlung keine ausgeprägten Einflüsse auf die Zellzahlen im Gesamtepithel ermittelt werden. Die durchschnittliche Gesamtzellzahl im unbehandelten Epithel beträgt in der vorliegenden Arbeit  $360 \pm 19$  Zellen/mm Epithellänge. In der Germinativschicht befinden sich 72 % der gesamten Zellzahl ( $258 \pm 14$  Zellen/mm Epithellänge). Lediglich sind die Zellzahlen für die funktionelle Schicht ab dem 17. Tag etwas höher als im Kontrollversuch. Um den genauen Mechanismus dieser Erhöhung der funktionellen Zellzahlen zu klären, wären weiterführende Untersuchungen nötig.

Die Schichtdicke des Epithels wird zum Einen bestimmt durch die Größe der Zellen und zum Anderen durch die Zelldichte. Innerhalb der ersten Bestrahlungswoche fällt die Schichtdicke in der Germinativschicht bei den L-NAME-behandelten Tieren stark ab. In den eigenen wie auch in früheren Untersuchungen konnte eine strahlenbedingte Volumenzunahme von Zellen nachgewiesen werden. DÖRR (1997) beschreibt eine Zunahme des Zellvolumens unter Bestrahlung um 130 %. Es ist möglich, dass die L-NAME-Gabe die Zunahme des Zellvolumens infolge der Bestrahlung verhindert.

### 5.5.3 Wirkmechanismen von L-NAME

L-NAME hat keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit, d.h. auf die Zahl der Gewebstammzellen und deren intrinsische Strahlenempfindlichkeit (siehe Abschnitt 2.5.1). Somit muss angenommen werden, dass NO-vermittelte Prozesse für die Ausprägung der ulzerativen Epithelreaktion keine Relevanz besitzen.

Die vorliegenden Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass L-NAME einen Einfluss auf die Proliferation während der fraktionierten Bestrahlung hat. Es ist möglich, dass L-NAME zu einem vermehrten Nachschub aus der germinativen Schicht führt. Ein Hinweis hierauf ist die Zellzahlerhöhung im behandelten Epithel während der ersten Bestrahlungswoche. Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus von L-NAME ist die Reduktion der strahlenbedingten Zunahme des Zellvolumens. Ein Abfall der Schichtdicke in der Germinativschicht der behandelten Tiergruppe, bei annähernd gleichen Zellzahlen bei behandelten und unbehandelten Tieren, weist eindeutig darauf hin. Ein erhöhtes Zellvolumen kann die Folge eines intrazellulären Ödems oder gesteigerten Synthese von Hyalingranula sein. Die Bestrahlung führt zur Bildung von freien Radikalen, u.a. ROS. Strahleninduzierte freie Radikale führen zu einer intrazellulären Ödembildung, Hyalinisierung und Schäden an der DNA. KHAN et al. (2003) wiesen bereits die protektive Wirkung von L-NAME durch eine Abnahme des Auftretens strahleninduzierter Micronuclei und damit an der DNA nach. Der genaue Mechanismus kann hier jedoch nicht geklärt werden und bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Inwiefern die NO-Hemmung einen Einfluss auf die Entzündungs- bzw. Gefäßreaktion auf die Bestrahlung hat, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Es ist jedoch auch diesbezüglich festzustellen, dass ein Einfluss der NO-vermittelten Signalkaskaden auf die epitheliale Strahlenreaktion (Ulkus-Induktion) nicht nachzuweisen ist.

## 5.6 Inhibition von iNOS durch L-NAME

NOZAKI et al. (1997) fanden nach Lungenbestrahlung (Ratte) eine gesteigerte NO-Synthese in Folge iNOS-Induktion in Alveolarmakrophagen und alveolären Epithelzellen. Durch die Behandlung mit L-NAME (0,15 mg/kg i.p. von Tag -3 bis Tötung) konnte das Krankheitsgeschehen reduziert werden.

Bei strahleninduzierten Enteritiden (abdominale Bestrahlung) war eine verbesserte mukosale Integrität und eine reduzierte Infiltration mit Neutrophilen bei den L-NAME-behandelten Gruppen [Gruppe 1: 30 mg/kg/Tag (oral 3 Tage vor und nach Bestrahlung), Gruppe 2: 30 mg/kg/Tag oral (3 Tage lang nach Bestrahlung)] im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu verzeichnen (ERBIL et al. 1998). Bei der Tiergruppe, welche vor und nach der Bestrahlung L-NAME verabreicht bekam, waren die positiven Effekte ausgeprägter.

KHAN et al. (2003) untersuchten die Wirkung von L-NAME im Rahmen der Strahlenreaktion der Lunge (Ratte). L-NAME wurde in einer Dosis von 0,2 mg/kg jeweils 30 Minuten vor oder direkt nach der einmaligen Strahlenexposition injiziert. Eine protektive Wirkung von L-NAME konnte in Form der Reduktion strahleninduzierter Micronuclei in pulmonalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Am effektivsten erwies sich die Verabreichung des NOS-Inhibitors direkt nach der Bestrahlung. Die

Bedeutung dieses Endpunktes für die gewebliche Strahlenreaktionen bleibt jedoch unklar.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde L-NAME in der gleichen Dosierung, welche für die Untersuchungen an der Rattenlunge von KHAN et al. (2003) verwendet wurde, an den Bestrahlungstagen 30 Minuten vor Bestrahlung appliziert. Eine Behandlung nach Bestrahlung wurde in den eigenen Untersuchungen nicht durchgeführt.

Eine Strahlenexposition führt ebenso wie eine Infektion zur Aktivierung von Makrophagen (KUBES 2000, JAAL et al. 2010). Somit können mit entsprechender Vorsicht Rückschlüsse aus Infektionsversuchen auf die Wirksamkeit von L-NAME gezogen werden. NEMEC et al. (2009) konnten nach Inokulation von Mäusen mit *Porphyromonas gingivalis* die NO-Konzentration im Plasma durch einen selektiven iNOS-Inhibitor senken. L-NAME (50 mg/kg i.p.) erhöhte dagegen den Plasmaspiegel von NO, führte aber in Lunge, Leber und Gehirn zu einer Absenkung der NO-Produktion (NEMEC et al. 2010). Ein organ- bzw. gewebsabhängiger Effekt von L-NAME ist somit offensichtlich (NEMEC et al. 2010). L-NAME ist ein unselektiver NOS-Inhibitor, d.h. der Einfluss der cNOS ist in den durchgeführten Untersuchungen zur Strahlenreaktion der Mundschleimhaut nicht berücksichtigt. Die Untersuchungen von NEMEC et al. (2010) lassen keine Rückschlüsse auf die Wirksamkeit an der Mundschleimhaut zu.

Desweiteren muss die vielfach höhere Dosis des Medikamentes bei NEMEC et al. (2010) Berücksichtigung finden. Der immunregulatorische Effekt von L-NAME ist offensichtlich dosisabhängig. Bei einer durch caecale Punktion induzierten Peritonitis bei Ratten unterdrückt eine geringe Dosis von L-NAME (5 mg/kg pro Tag) die Entzündung, hingegen aktivieren hohe Dosen (50 mg/kg pro Tag) Milzmakrophagen (HSIAO et al. 2012). Unklar ist auch, welchen Einfluss die Induktion der iNOS (bakteriell, strahleninduziert oder medikamenteninduziert) und die daraus folgenden Pathomechanismen auf die Wirksamkeit der iNOS-Inhibition durch L-NAME haben. LEITÃO et al. (2011) induzierten durch Methotrexat eine gastrointestinale Mukositis. Sie wiesen eine Reduktion von Schleimhautschäden, entzündlichen Veränderungen und Zelltod durch intraperitoneale L-NAME-Applikation (20 mg/kg) nach. Hingegen hatte L-NAME keinen protektiven Effekt auf eine durch Fluorouracil (5-FU)-induzierte gastrointestinale Mukositis bei Hamstern (LEITÃO et al. 2007). VARDARELI et al. (2003) konnten ebenso keinen positiven Effekt durch L-NAME-Gabe (50 mg/kg/Tag intraperitoneal oder intrarektal) nach TNBS- (2,4,6-Trinitrobenzolsäure)-induzierter Colitis nachweisen. Es ist möglich, dass direkte und indirekte NF- $\kappa$ B-Aktivierung einen Einfluss auf die Wirkung von iNOS-Inhibitoren haben. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch ionisierende Strahlung ist direkt. Die sekundäre bzw. indirekte Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch LPS bzw. Cytokine erfolgt über die Än-

derung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die Hemmung der cNOS und einen damit verbundenen Abfall der intrazellulären NO-Konzentration (siehe dazu Abschnitt 2.8.2). Die Aktivierung über LPS/Cytokine ist somit wesentlich komplexer. Der unselektive NOS-Inhibitor führt ebenso an der cNOS zu einer Hemmung. In der Folge sinkt die NO-Konzentration unter physiologische Werte und eine zusätzliche NF- $\kappa$ B-Aktivierung erfolgt. Es wäre möglich, dass die Wirkung von L-NAME als unselektiver NOS-Inhibitoren an der iNOS durch eine zusätzliche Wirkung an der cNOS beeinträchtigt ist. Das Ausmaß der Beeinflussung durch eine zusätzliche cNOS-Inhibierung könnte davon abhängig sein, ob eine direkte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch ROS (z.B. durch ionisierende Strahlung) stattfindet oder über die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und cNOS.

Die bisherigen Untersuchungen ergeben somit kein einheitliches Bild zur Wirksamkeit von L-NAME, was auf unterschiedliche Dosierung, Dauer und Applikationsart, vor allem aber auf die unterschiedlichen Gewebe, Tiermodelle und Endpunkte zurückgeführt werden muss.

## 6. Ausblick

Die radiogene Mucositis enoralis ist die wichtigste frühe Nebenwirkung der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren in der Human-, wie auch in der Tiermedizin. Sie beeinträchtigt signifikant das Wohlbefinden und die Lebensqualität der Patienten und birgt ein erhöhtes Infektionsrisiko. Zudem resultiert häufig eine Unterbrechung der Therapie, welche mit einer Verringerung der lokalen Tumorkontrolle einhergeht. Jedoch existiert derzeit kein allgemein gültiges, biologisch begründetes Protokoll zur Prophylaxe oder Therapie der radiogenen Mukositis; es sind ausschließlich supportive und symptomatische Maßnahmen etabliert.

Einen aktuellen Forschungsansatz zur biologisch ausgerichteten Beeinflussung von Nebenwirkungen der Strahlentherapie stellt die Modulation der NO-Synthese dar. Tierexperimentelle Arbeiten konnten den Einfluss einer NO-Synthese-Hemmung auf verschiedene radiogene Normalgewebseffekte, wie Enteritis, Pneumonitis und Lungenfibrose, nachweisen (NOZAKI et al. 1997, KHAN et al. 2003, ERBIL et al. 1998). Eine Stimulation von NF- $\kappa$ B durch ionisierende Strahlung führt zur Expression von iNOS und zur NO-Synthese, welche wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B beitragen. Die radiogene Aktivierung von Makrophagen und strahleninduzierte Vasodilatation könnten Folge dieser Strahleneffekte sein (JAAL et al. 2010). Eine Hemmung von iNOS moduliert diese Veränderungen, ohne dass bisher die Relevanz dieser Prozesse für die epitheliale Strahlenreaktion untersucht wurde. Die Hemmung der iNOS könnte Auswirkungen auf die Strahlenwirkung an der Mundschleimhaut haben. L-NAME ist ein nichtselektiver NOS-Inhibitor. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine iNOS-Inhibierung mittels L-NAME keinen signifikanten Einfluss auf die Strahlentoleranz der Mundschleimhaut hat. NO-bedingte parakrine Effekte sind deshalb offensichtlich für die epitheliale Strahlenreaktion nicht relevant. Damit ist die Strategie einer iNOS-Hemmung mittels L-NAME nicht aussichtsreich und sollte nicht in klinischen Studien getestet werden.

## 7. Zusammenfassung

Jessica Schöllner

Modifikation der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut (Maus) durch Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase mittels nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME)

Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und Universitätsklinik für Strahlentherapie der Medizinischen Universität Wien

Eingereicht im Februar 2015

81 Seiten, 23 Abbildungen, 16 Tabellen, 204 Literaturangaben, 1 Anhang

Schlüsselwörter: Einzeit-, fraktionierte Bestrahlung, radiogene Mucositis enoralis, L-NAME, Tiermodell

**Einleitung:** Die Mucositis enoralis ist eine häufige und dosislimitierende Nebenwirkung der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind komplex und beinhalten die Reaktionen und Interaktionen von Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Gefäßendothelzellen. Dies schließt die vermehrte Bildung von Stickstoff-Monoxid (NO) in Folge einer Stimulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) ein.

**Ziele der Untersuchungen:** Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung von L-NAME (nitro-L-Arginin-Methyl-Ester), einem unselektiven Inhibitor der NOS, auf die Strahlenreaktion der oralen Mukosa im etablierten Tiermodell der Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus zu untersuchen.

**Materialien und Methoden:** Die Untersuchungen erfolgen mit Mäusen des Inzucht-Wildtypstammes C3H/Neu. Als Bestrahlungstechniken kommen die perkutane Schnauzenbestrahlung (200 kV Röntgenstrahlung) und/oder die lokale Bestrahlung (25 kV Röntgenstrahlung) eines 3·3 mm<sup>2</sup> großen Testfeldes der Zungenunterseite der Maus zum Einsatz. In Fraktionierungsprotokollen werden 5x3 Gy/Woche über 1 (Tage 0-4) sowie 2 Wochen (Tage 0-4, 7-11) auf die gesamte Schnauze der Tiere appliziert. Anschließend erfolgt eine lokale Aufsättigungsbestrahlung mit gestaffelten Dosen (5 Dosisgruppen, je 10 Tiere) zur Generierung kompletter Dosis-Effekt-Kurven (Tag 7 bzw. 14). Einzeitbestrahlungen des lokalen Testfeldes finden ebenfalls mit gestaffelten Dosen statt.

L-NAME (täglich 0,2 mg/kg i.p.) wird an den Bestrahlungstagen 30 Minuten vor der Bestrahlung appliziert. Bei Einzeitbestrahlung werden 2 verschiedene Behandlungszeiträume getestet: 3 Tage vor der Bestrahlung bis zur Erstdiagnose (-3/D) oder Ausheilung der Ulzerationen (-3/H). In Kombination mit fraktionierter Bestrahlung über 1 Woche werden 3 Zeiträume untersucht (-3/7, -3/D oder -3/H). Bei 2 Wochen fraktionierter Bestrahlung erfolgt die L-NAME-Gabe in folgenden Intervallen: -3/7, -3/D, -3/H, -3/14 oder 7/14. Als quantaler Endpunkt für Dosis-Effekt-Analysen dient die Ulzeration der Schleimhaut im Testfeld. Mittels Logit-Analyse werden Dosis-Effekt-Beziehungen ermittelt. Der  $ED_{50}$ -Wert und dessen Standardabweichung  $\sigma$  dienen der Charakterisierung der Dosis-Effekt-Kurven.

In histologischen Untersuchungen werden maximal 10 Fraktionen zu 3 Gy über 2 Wochen appliziert, mit/ohne Gabe von L-NAME von Tag -3 bis zur Tötung. Die Zungenentnahme erfolgt bei je 5 Tieren in zweitägigen Abständen (Tag 1 bis 25).

**Ergebnisse:** Für die alleinige Einzeitbestrahlung ergibt sich eine signifikante Dosisabhängigkeit der Ulkusinzidenz mit einer  $ED_{50}$  von  $13,6 \pm 1,0$  Gy. Die mittlere Latenzzeit beträgt  $10,6 \pm 1,1$  Tage, die durchschnittliche Ulkusdauer  $3,5 \pm 1,0$  Tage. Nach alleiniger einwöchig fraktionierter Bestrahlung beträgt die  $ED_{50}$  der Testbestrahlung  $12,3 \pm 0,8$  Gy. L-NAME von Tag -3 bis Tag 6 bzw. -3/D hat keinen signifikanten Einfluss ( $ED_{50}$   $13,3 \pm 1,2$  Gy bzw.  $12,8 \pm 1,0$  Gy). Lediglich für den Applikationszeitraum Tag -3/H kann eine signifikante Erhöhung der  $ED_{50}$  auf  $14,7 \pm 1,7$  Gy ( $p=0,0298$ ) nachgewiesen werden. Die Testbestrahlung nach 2-wöchiger Fraktionierung ohne L-NAME ergibt eine  $ED_{50}$  von  $13,0 \pm 0,1$  Gy. L-NAME hat wiederum keinen signifikanten Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der Mundschleimhaut ( $ED_{50}$ -Werte: -3/6 -  $12,9 \pm 0,1$  Gy, -3/14 -  $13,0 \pm 0,1$  Gy, -3/H -  $13,8 \pm 1,4$  Gy und 7/14 -  $13,1 \pm 0,8$  Gy).

Während alleiniger fraktionierter Bestrahlung nimmt die Zellzahl zunächst ab (Tag 11: 70 %). Im Anschluss steigt sie über das Ausgangsniveau (Tag 19: 126 %). Für die L-NAME-behandelte Schleimhaut findet sich ein qualitativ vergleichbarer Verlauf; es zeigt sich lediglich eine geringfügige Erhöhung der Zellzahl in der funktionellen Schicht (150 % statt 140 %). Die Epitheldicke nimmt unter L-NAME-Behandlung in den ersten Tagen der Nachbeobachtungszeit deutlich zu.

**Schlußfolgerungen:** Zusammenfassend erweist sich in der vorliegenden Arbeit nur die L-NAME-Applikation -3/H bei einwöchig fraktionierter Bestrahlung als wirksam, wobei der Grund für diese selektive Wirkung unklar bleibt. Offensichtlich sind NO-vermittelte Prozesse ohne substanzielle Relevanz für die epitheliale Strahlenreaktion der Mundschleimhaut. Auf der Basis dieser Ergebnisse ist die Hemmung von iNOS durch L-NAME keine aussichtsreiche Strategie zur Reduktion der radiogenen Mucositis enoralis, und sollte deshalb auch nicht in klinischen Studien verfolgt werden. Die Frage, ob andere (i)NOS-Hemmstoffe ein mukoprotektives Potential besitzen, sollte in weiteren, translationalen strahlenbiologischen Studien geklärt werden.

## 8. Summary

Jessica Schöllner

Modification of the radiation response of oral mucosa (mouse) by inhibition of nitric oxide synthase via nitro-L-arginin-methyl-ester (L-NAME)

Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and Department of Radiation Oncology, Medical University of Vienna

Submitted in February 2015

81 pages, 23 figures, 16 tables, 204 references, 1 appendix

Keywords: single-dose & fractionated-radiation exposure, oral mucositis, L-NAME, animal model

**Introduction:** Oral mucositis is a frequent and dose-limiting side effect of radiotherapy of advanced head-and-neck tumours. The underlying pathomechanisms are complex, based on the orchestrated response of epithelial cells, fibroblasts, macrophages and vascular endothelial cells. This includes the increased generation of nitrogen oxide (NO) as a consequence of the stimulation of the inducible NO-synthase (iNOS).

**Intention of investigation:** The present study hence focuses on the effect of L-NAME (nitro-L-arginin-methyl-ester), an unselective inhibitor of NOS, on the radiation response of oral mucosa in the established animal model of the lower tongue surface.

**Materials and methods:** All experiments are performed with mice of the inbred, wild-type C3H/Neu-strain. Irradiation techniques comprise percutaneous irradiation of the entire snout of the animals (200 kV X-rays) and/or local exposure (25 kV X-rays) of a 3.3 mm<sup>2</sup> test field at the lower tongue surface of the mice. In fractionation protocols, 5x3 Gy/week are administered to the snouts over 1 week (days 0-4) or 2 weeks (days 0-4, 7-11), respectively. All fractionation protocols are concluded by local top-up irradiation (day 7 or 14, respectively) with graded doses (5 dose groups, 10 animals each) in order to generate complete dose effect curves. Similarly, single dose irradiation of the local test area is applied with graded doses.



L-NAME (daily 0.2 mg/kg i.p.) is given on irradiation days 30 minutes before irradiation. In combination with single dose irradiation, two time intervals are tested: starting from 3 days before irradiation until first ulcer diagnosis (-3/D) or until complete healing of the ulcerations (-3/H). With fractionation over 1 week, 3 intervals are applied (-3/7, -3/D or -3/H). Combined with 2 weeks of fractionated irradiation, L-NAME is administered -3/7, -3/14, -3/D, -3/H, or 7/14. Mucosal ulceration within the test area is used as a quantal endpoint for dose-effect analyses. Logit analyses are applied to generate complete dose-effect curves. The  $ED_{50}$ -value and its standard deviation  $\sigma$  serve to characterize these dose-effect relationships.

In histological studies, a maximum of 10 fractions of 3 Gy are administered over 2 weeks, with/without application of L-NAME from day -3 until the animals are sacrificed. Tongues from 5 mice are excised per day every second day (day 1 until 25).

**Results:** Single dose irradiation alone results in a significant dose-dependence of ulcer incidence, with an  $ED_{50}$  of  $13.6 \pm 1.0$  Gy. The  $ED_{50}$  for top-up irradiation after 1 week of fractionation alone is  $12.3 \pm 0.8$  Gy. L-NAME given from day -3 to 6 or -3/D has no significant effect ( $ED_{50}$   $13.3 \pm 1.2$  Gy and  $12.8 \pm 1.0$  Gy), respectively. For the interval from day -3 to ulcer healing, a significant increase of the  $ED_{50}$  to  $14.7 \pm 1.7$  Gy ( $p=0.0298$ ) is found. The  $ED_{50}$  for test irradiation after 2 weeks of fractionation without L-NAME is  $13.0 \pm 0.1$  Gy. L-NAME has no significant effect on the radiation tolerance of the oral mucosa ( $ED_{50}$  values: -3/6 -  $12.9 \pm 0.1$  Gy, -3/14 -  $13.0 \pm 0.1$  Gy, -3/H -  $13.8 \pm 1.4$  Gy and 7/14 -  $13.1 \pm 0.8$  Gy).

During fractionated irradiation alone, cell numbers initially decrease (day 11: 70 %). Subsequently, cell counts increase above the baseline control level (day 19: 126 %). In the L-NAME treated mucosa, changes in cell counts are qualitatively similar; only cell counts in the functional layers are eventually slightly further increased (150 % vs. 140 %). Epithelial thickness increases in the first days during L-NAME treatment.

**Conclusions:** In conclusion, in the present study only the protocol with L-NAME administration -3/H in combination with one week of fractionation demonstrates a significant reduction of ulcer incidence; the reason for the selectivity of the effect remains unclear. Obviously are NO-mediated processes without any substantial relevance for the epithelial radiation processes. On the basis of the present results, inhibition of iNOS by L-NAME does not represent a promising strategy for the reduction of radiation-induced oral mucositis, and should not be followed in clinical studies. The question if other inhibitors of (i)NOS do have a mucoprotective potential may be subject to further, translational radiobiological investigations.

## 9. Literaturverzeichnis

**Aas** M, Moe L, Gamlem H, Skretting A, Ottesen N, Bruland OS. Internal radionuclide therapy of primary osteosarcoma in dogs, using <sup>153</sup>Sm-Ethylene-diamino-tetramethylene-phosphonate (EDTMP). Clin Cancer Res. **1999**;5:3148s–52s.

**Abu-Soud** HM, Feldmann PI, Clark P, Stuehr DJ. Electron transfer in the nitric-oxide synthases. J Biol Chem. **1994**;269:32318–26.

**Al-Nawas** B, Grötz KA, Kutzner J, Brahm R, Kuffner HD, Wagner W. Ätiologie der infizierten Osteoradionekrose des Kiefer-Gesichts-Bereiches: Einfluss der periradiotherapeutischen Betreuung. Deutsch Zahnärztl Z. **2001**;56:43–6.

**Arenas** M, Gil F, Gironella M, Hernández V, Jorcano S, Biete A et al. Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice. Int J Radiat Oncol Biol Phys. **2006**;66:560–7.

**Bentzen** SM, Saunders MI, Dische S, Bond SJ. Radiotherapy-related early morbidity in head and neck cancer: quantitative clinical radiobiology as deduced from the chart trial. Radiother Oncol. **2001**;60:123–35.

**Bjarnason** GA, Jordan RC, Sothorn RB. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. Am J Pathol. **1999**;154:613–22.

**Blackwood** L, Dobson JM. Radiotherapy of oral malignant melanoms in dogs. J Am Vet Med Assoc. **1996**;209:98–102.

**Bonett** BN, Egenvall A, Hedhammer A, Olson P. Mortality in over 350,000 insured swedish dogs from 1995-2000: Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. Acta Vet Scand. **2005**;46:105–20.

**Boston** SE, Duerr F, Bacon N, LARUE S, EHRHART EJ, WITHROW S. Intraoperative radiation for limb sparing of the distal aspect of the radius without transcarpal plating in five dogs. Vet Surg. **2007**;36:314–23.

**Bray** F, Jemal A, Ferlay J, Grey N, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (20082030): a population-based study. *Lancet Oncol.* **2012**;13:790–801.

**Brearley** MJ, Hayes AM, Murphy S. Hypofractionated radiation therapy for invasive thyroid carcinoma in dogs: a retrospective analyses of survival. *J Small Anim Pract.* **1999**;40:206–10.

**Bregazzi** VS, LaRue SM, Powers BE, Fettman MJ, Ogilvie GK, Withrow SJ. Response of feline oral squamous cell carcinoma to palliative radiation therapy. *Vet Radiol Ultrasound.* **2001**;42:77–9.

**Bronden** LB, Eriksen T, Kristensen AT. Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasm in Danish dogs - data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Vet Scand.* **2009**;51:54–60.

**Brooks** MB, Matus RE, Leifer CE, Alfieri AA, Patnaik AK. Chemotherapy versus chemotherapy plus radiotherapy in the treatment of tonsillar squamous cell carcinoma in the dog. *J Vet Int Med.* **1998**;2:206–11.

**Buchholz** J. Strahlentherapie beim Tier - wer profitiert davon? LBH:Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress; 2010 Jan 21–23; Leipzig: Leipziger Universitätsverlag GmbH; **2010**.

**Burholt** DR, Etzel SL, Schenken LL, Kovacs CJ. Digestive tract cell proliferation and food consumption patterns of Ha/ICR mice. *Cell Tissue Kinet.* **1985**;18:369–86.

**Burholt** DR. Oesophageal epithelial cell proliferation and food consumption patterns following irradiation. *Br J Cancer.* **1986**;53:SupplVII 7–8.

**Burns** ER, Scheving LE, Fawcett DF, Gibbs WM, Galatzan RE. Circadian influence in the frequency of labelled mitosis method in the stratified squamous epithelium of the mouse oesophagus and tongue. *Anat Rec.* **1975**;184:265–74.

**Büttof** R, Baumann M. Time in radiation oncology Keep it short! *Radiother Oncol.* **2013**;106:271–5.

**Byam-Cook** KL, Henson FND, Slater JD. Treatment of ocular and non-ocular sarcomas in 18 horses by interstitial brachytherapy with iridium-192. *Vet Rec.* **2006**;159:337–41.

**Cardnell** RJG, Mikkelsen RB. Nitric oxide synthase inhibition enhances the anti-tumor effect of radiation in the treatment of squamous carcinoma xenografts. *PLoS ONE.* **2011**;6.

**CaymanChemical.** Product information, L-NAME(hydrochloride), catalog No. 80210.2009 (zitiert vom 26. 10. **2014**)  
<<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/80210>>.

**Chun** R, Garrett LD, Vail DM. Cancer Chemotherapy In: Withrow SJ, MacEwen EG, Hrsg. Small animal clinical oncology. 4th Edition. Canada: Saunders Elsevier; **2007**. p. 163–92.

**Ciaputa** R, Kandefer-Gola M, Nowak M, Madej JA. Prevalence of tumours in domestic animals in the lower silesia (poland) in 2009-2011. Bull Vet Inst Pulawy. **2013**;57:53–9.

**Ciekot** PA, Powers BE, Withrow SJ, Straw RC, Ogilvie GK, LaRue SM. Histologically low-grade, yet biologically high-grade, fibrosarcomas of the mandible and maxilla in dogs: 25 cases (1982-1991). J Am Vet Med Assoc. **1994**;204:610–15.

**Colasanti** M, Suzuki H. The dual personality of NO. Trends Pharmacol Sci. **2000**;21:249–52.

**Collen** EB, Mayer MN. Acute oropharyngeal effects of full-course radiation treatment of tumors of the head. Can Vet J. **2008**;49:509–12.

**Cooley** DM, Schlittler DL, Glickman LT, Hayek M, Waters DJ. Exceptional longevity in pet dogs is accompanied by cancer resistance and delayed onset of major diseases. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. **2003**;58A:1078–84.

**Cotter** SM. Oral pharyngeal neoplasm in the cat. J Am Anim Hosp Assoc. **1989**;17:917–20.

**Crump** K, Thamm DH. Preface. In: Crump K, Thamm DH, Hrsg. Cancer Chemotherapy for the Veterinary Health Team. 1st Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Inc.; **2011**. p. ix–x.

Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.V. (**DEGRO**) Leitlinien in der Radioonkologie. Supportive Maßnahmen Version 2006. AG Nebenwirkungen / Supportivtherapie **2006** (zitiert vom 26. 10. 2014)  
<<http://www.degro.org/dav/html/download/pdf/LeitlinieSupportiveMassnahmen.pdf>>.

**DE Moura** RS, Rios AA, Santos EJ, Nascimento AB, CastroResende A, Neto ML et al. Role of the NO-cGMP pathway in the systemic antinociceptive effect of clonidine in rats and mice. Pharmacol Biochem Behav. **2004**;78:247–53.

**Dickerson** ME, Page RL, LaDue TA, Hauck ML, Thrall DE, Stebbins ME et al. Retrospective analysis of axial skeleton osteosarcoma in 22 large-breed dogs. J Vet Inter Med. **2001**;15:120–24.

**Dorn** CR, Priester WA. Epidemiologic analyses of oral and pharyngeal cancers in dogs, cats, horses and cattle. J Am Vet Med Assoc. **1976**;169:1202–06.

**Dörr** W. Untersuchungen zur Strahlenreaktion des unbehandelten und stimulierten Zungenepithels der Maus [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilian-Universität München; **1987**.

**Dörr W.** Strahlenbiologische Parameter der radiogenen Mucositis enoralis [Habilschr. med. vet]. Dresden: TU Dresden; **1997**.

**Dörr W.** Three A's of repopulation during fractionated irradiation in squamous epithelia: assymetry loss, acceleration of stem-cell divisions and abortive divisions. *Int J Radiat Biol.* **1997a**;72:635–43.

**Dörr W.** Modulation of repopulation processes in oral mucosa: experimental results. *Int J Radiat Biol.* **2003a**;79:531–37.

**Dörr W.** Oral mucosa. Response modification by keratinocyte growth factor In: Nieder C, Milas L, Ang KK, Hrsg. Modification of radiation response - Cytokines, growth factors and other biological targets. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; **2003b**. p. 113–22.

**Dörr W.** Skin and other reactions to radiotherapy - Clinical presentation and radiobiology of skin reactions. *Front Radiat Ther Oncol.* **2006a**;39:96–101.

**Dörr W.** Strahlenpathologie In: Wannenmacher M, Debus J, Wenz F, Hrsg. Strahlentherapie, Teil 1. Berlin, Heidelberg: Springer; **2006b**. p. 81–91.

**Dörr W.** Pathogenesis of normal tissue side effects. In: Joiner M, Van der Kogel A, Hrsg. Basic clinical radiobiology, 4th . London: Hodder Arnold; **2009a**. p. 169–90.

**Dörr W.** The volume effect in radiotherapy. In: Joiner M, Van der Kogel A, Hrsg. Basic clinical radiobiology, 4th . London: Hodder Arnold; **2009b**. p. 191–206.

**Dörr W.** Time factors in normal-tissue responses to irradiation. In: Joiner M, Van der Kogel A, Hrsg. Basic clinical radiobiology, 4th . London: Hodder Arnold; **2009c**. p. 149–57.

**Dörr W.** Strahlenwirkung am Normalgewebe. Prinzipien der Schädigung und Protektion. *Nuklearmedizin.* **2010**;49:S53–58.

**Dörr W, Kummermehr J.** Accelerated repopulation of mouse tongue epithelium during fractionated irradiations or following single doses. *Radiother Oncol.* **1990**;17:249–59.

**Dörr W, Kummermehr J.** Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal conditions and following single radiation dose irradiation. *Virchows Arch B Cell Pathol.* **1991**;60:287–94.

**Dörr W, Kummermehr J.** Increased radiation tolerance of mouse tongue epithelium after local conditioning. *Int J Radiat Biol.* **1992**;61:369–79.

**Dörr W, Arui J, Beisker W, Beisker W, Schultz-Hector S.** Cell kinetic studies in mouse tongue mucosa by autoradiographic, immunohistochemical and flow cytometric techniques. *Cell Prolif.* **1994**;27:321–32.

- Dörr** W, Jacubek A, Kummermehr J, Herrmann T, Dölling-Jochem I, Eckelt U. Effects of stimulated repopulation on oral mucositis during conventional radiotherapy. *Radiother Oncol.* **1995**;37:100–7.
- Dörr** W, Brankovic K, Hartmann B. Repopulation in mouse oral mucosa: Changes in the effect of dose fractionation. *Int J Radiat Biol.* **2000**;76:383–90.
- Dörr** W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol.* **2001**;61:223–31.
- Dörr** W, Spekl K, Martin M. Radiation-induced oral mucositis in mice: strain differences. *Cell Prolif.* **2002**;35:60–67.
- Dörr** W, Groetz KA, Hartmann JT, Riesenbeck D. Orale Mukositis. Experimentelle und klinische Ansätze zur Prävention und Behandlung. *Onkologe.* **2007**;13:150–7.
- Dörr** W, Herrmann T, Reitemeier B, Riesenbeck D, Grötz KA. Folgen der Strahlentherapie in der Mundhöhle. *Zahnmedizin up2date.* **2008**;6:543–69.
- Dörr** W, Herrmann T. Frühe Strahlenveränderungen der Gewebe. In: Bamberg M, Mollis M, Sack H, Hrsg. *Radioonkologie, Band 1, Grundlagen*; 2. Aufl. Gemering/-München: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH; **2009.** p. 302–9.
- Dörr** W, Haagen J, Hartmann JT. Behandlung der oralen Mukositis in der Onkologie. Was ist wirklich wirksam? *Im Focus Onkologie.* **2010**;7-8:1–5.
- Elliot** KM, Mayer MN. Cancer treatment therapies. *Can Vet J.* **2009**;50:771–2.
- Elting** LS, Keefe DM, Sonis ST, Garden AS, Spijkervet FK, Barasch A et al. Patient-reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy: demonstration of increased frequency, severity, resistance to palliation, and impact on quality of life. *Cancer.* **2008**;113:270–1.
- Erbil** Y, Dibekoglu C, Turkoglu U, Ademoglu E, Berber E, Kizir A et al. Nitric Oxide and Radiation Enteritis. *Eur J Surg.* **1998**;164:863–8.
- Evans** SM, Shofer F. Canine oral nontonsillar squamous cell carcinoma. Prognostic factors for recurrence and survival following orthovoltage radiation therapy. *Vet Radiol.* **1988**;29:133–7.
- Fehrmann** A. Interaktion einer Blockade des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) mit der Gabe von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) bei der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut - tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen [Dissertation med. vet]. Leipzig: Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig; **2009.**

**Fiani N**, Verstraete FMJ, Kass PH, COS DP. Clinicopathologic characterization of odontogenic tumors and focal fibrous hyperplasia in dogs: 152 cases (1995-2005). *J Am Vet Med Assoc.* **2011**;238:495–500.

**Fidel J**, Schiller I, Hauser B, Jausi Y, Rohrer-Bley C, Roos M et al. Histiocytic sarcomas in flat-coated retrievers: a summary of 37 cases (November 1998- March 2005). *Vet Comp Oncol.* **2006**;4:63–74.

**Fidel JL**, Sellon RK, Houston RK, Wheeler BA. A nine-day accelerated radiation protocol for feline squamous cell carcinoma. *Vet Radiol Ultrasound.* **2007**;48:482–5.

**Fidel J**, Lyons J, Tripp C, Wheeler B, Ruiz A. Treatment of oral squamous cell carcinoma with accelerated radiation therapy and concomitant carboplatin in cats. *J Vet Int Med.* **2011**;25:504–11.

**Foale R**, Demetriou J. Principles of cancer radiotherapy. In: Small animal oncology. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydnex, Toronto: Saunders Elsevier; **2010**. p. 35–36.

**Forrest LJ**, Chun R, Adams WM, Cooley AJ, Vail DM. Postoperative Radiotherapy for Canine Soft Tissue Sarcoma. *J Am Vet Med.* **2000**;14:578–82.

**Franke C**, Meyer C. Die Radiosynoviorthese (RSO) in der Therapie der Lahmheit des Hundes. *Der Nuklearmediziner.* **2010**;33:38–42.

**Furfine ES**, Harmon MF, Paith JE, Garvey EP. Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by l-NGnitroarginine. *Biochemistry.* **1993**;32:8512–7.

**Gamer MT**. Der Einsatz von Megavoltage-Bestrahlungstherapie und Elektronen bei der Behandlung von Weichteilsarkomen des Hundes. Eine retrospektive Studie von 73 Hunden.[Dissertation med vet.] Berlin: Freie Universität Berlin; **2004**.

**Gardner DG**. Epulides in the dog: A review. *J Oral Pathol Med.* **1996**;25:32–7.

**Gasser RF**, Scheving LE, Pauly JE. Circadian rhythms in the mitotic index of the basal epithelium and in the uptake rate of 3H-thymidine by the tongue of rat. *J Cell Physiol.* **1972**;80:437–42.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (**GEKID**). Krebsneuerkrankung (Inzidenz) gesamt **2011**(zitiert vom 14. 10. 2014) <<http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/TabellenD.php>>.

**Gillette EL**, LaRue SM, Gillette SM. Normal tissue tolerance and management of radiation injury. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* **1995**;10:209–13.

**Gogolok J**, Schuemer R, Ströhlein G. Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS. Band 1: Einführung in das Programmsystem, Datenmanagement und Auswertung. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag; **1992**.

**Goldschmidt** MH, Hendrick MJ. Tumours of the skin and soft tissues. In: Meuten DJ, Hrsg. Tumors in Domestic Animals, Fourth Edition. Iowa: Iowa State Press; **2002**. p. 45–117.

**Grier** CK, Mayer MN. Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. Can Vet J. **2007**;48:1189–91.

**Griffith** OW, Kilbourn RG. Nitric oxide synthase inhibitors: Amino acids. Methods Enzymol. **1996**;268:375–92.

**Hackbarth** S. Expression von MAPK und NF- $\kappa$ B p50 in der Mundschleimhaut (Maus) unter fraktionierter Bestrahlung - Einfluss einer EGFR-Inhibition.[Bachelorarbeit Biotechnologie].Görlitz: FH Zittau/Görlitz; **2010**.

**Hahn** KA, DeNicola DB, Richardson RC, HAHN EA. Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system. J Small Anim Pract. **1994**; 35:251–6.

**Hartung** K. Röntgentherapie entzündlicher Erkrankungen beim Hund. Tierarzt Prax. **1980**;8:363–6.

**Henschke** V, Henschke G. Zur Technik der Operationsbestrahlung. Strahlentherap. **1944**;74:223–39.

**Herrmann** TH, Baumann M. Prolongation of latency or overall treatment time by unplanned radiation pauses. The clinical importance of compensation. Strahlenther Onkol. **2005**;181:615–7.

**Herrmann** TH, Baumann M, Dörr W. Strahlenwirkung auf Normalgewebe. In: Herrmann TH, Baumann M, Dörr W, Hrsg. Klinische Strahlenbiologie kurz und bündig. München: Elsevier GmbH; **2006a**. p. 79–128.

**Herrmann** TH, Baumann M, Dörr W. Strahlenwirkung auf Zellen. In: Herrmann TH, Baumann M, Dörr W, Hrsg. Klinische Strahlenbiologie kurz und bündig. München: Elsevier GmbH; **2006b**. p. 11–45.

**Herrmann** TH, Baumann M, Dörr W. Strahlenwirkung auf Tumoren. In: Herrmann TH, Baumann M, Dörr W, Hrsg. Klinische Strahlenbiologie kurz und bündig. München: Elsevier GmbH; **2006c**. p. 47–78.

**Herzog** A, Buchholz J, Ruess-Melzer K et al. Kombinierte Anwendung von Strahlentherapie und DNS Tumor Vakzine zur Behandlung des oralen malignen Melanoms beim Hund: Eine Pilotstudie. Schweiz Arch Tierheilkd. **2013**;155:135–42.

**Hölscher** T, Seibt A, Appold S, Dörr W, Herrmann T, Huttenbrink KB et al. Effects of radiotherapy on olfactory function. Radiother Oncol. **2005**;77:8–92.



**Hoyt** RF, Withrow SJ. Oral malignancy in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* **1984**;20:83–92.

**Hsiao** CC, Lee CH, Tsao LY, Lo HC. The dose-dependent immunoregulatory effects of the nitric oxide synthase inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methyl-ester in rats with sub-acute peritonitis. *PLoS ONE.* **2012**;7:1–9.

**Hutson** CA, Willauer CC, Walder EJ, Stone JL, Klein MK. Treatment of mandibular squamous cell carcinoma in cats by use of mandibulectomy and radiotherapy: seven cases (1987-1989). *J Am Vet Med Assoc.* **1992**;201:777–81.

**Izquierdo** JN, Gibbs SJ. Circadian rhythms of DNA synthesis and mitotic activity in hamster cheek pouch epithelium. *Exp Cell Res.* **1972**;71:402–8.

**Jaal** J, Richter C, Dörr W. Effect of recombinant human keratinocyte growth factor (23rHuKGF, Palifermin) on inflammatory and immune changes in mouse tongue during fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol.* **2010**;86:860–6.

**Jones** PD, Lorimier LP, Kitchell BE, Losonsky JM. Gemcitabine as a radiosensitizer for nonresectable feline oral squamous cell carcinoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* **2003**;39:463–7.

**Kamprad** F, Ranft D, Weber A, Hildebrandt G. Functional changes of the gustatory organ caused by local radiation exposure during radiotherapy of the head-and-neck region. *Strahlenther Onkol.* **2008**;184:157–62.

**Kandel** B. Strahlentherapie in der Kleintierpraxis. *Prakt Tierarzt.* **2004**;85:476–81.

**Kandel-Tschiederer** B. Strahlentherapie zur Schmerzbehandlung von Tumorerkrankungen. In: Kessler M, Hrsg. *Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze.* Stuttgart: Enke Verlag; **2013**. p. 190–2.

**Kaser-Hotz** B, Fodor G, Cordt-Riehle I, Blattmann H, Munkel G, Egger E et al. Radiotherapie in der Kleintiermedizin: Grundlagen, Indikationen und Bedeutung. *Schweiz Arch Tierheilkd.* **1994**; 136:319–28.

**Kaser-Hotz** B. Prinzipien der Strahlentherapie. In: Kessler M, Hrsg. *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen.* Berlin: Parey Buchverlag; **2005**. p. 151–62.

**Kaser-Hotz** B, Buchholz J. Prinzipien der Strahlentherapie. In: Kessler M, Hrsg. *Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze.* Stuttgart: Enke Verlag; **2013**. p. 132–41.

**Keefe** DM. Mucositis guidelines: what have they achieved, and where to from here? *Supp Cancer Care.* **2006**;14:492–8.

- Kelsey** JL, Moore AS, Glickman LT. Epidemiologic Studies of Risk Factors for Cancer in Pet Dogs. *Epidemiol Rev.* **1998**;20:204–17.
- Kent** ML, Brennan MT, Noll JL, Fox PC, Burri SH, Hunter JC et al. Radiation-induced trismus in head and neck cancer patients. *Supp Cancer Care.* **2008**;16:305–9.
- Kessler** M. Prinzipien chirurgischer Onkologie. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; **2005a**. p. 105–12.
- Kessler** M. Tumoren der Maulhöhle. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; **2005b**. p. 252–74.
- Kessler** M. Tumoren des Gastrointestinaltrakts. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; **2013**. p. 257–304.
- Kessler** M, Kühnel S. Chirurgische Therapie oraler Plattenepithelkarzinome beim Hund - eine retrospektive Untersuchung bei 40 Patienten. Proceedings of 57 Jahreskongress DGK - DVG; 2011; Berlin **2011**.
- Khan** MA, Van Dyk J, Yeung IW, Hill RP. Partial volume rat lung irradiation: assessment of early DNA damage in different lung regions and effect of radical scavengers. *Radiother Oncol.* **2003**;66:95–102.
- Klasen** O. Krebsfälle in Deutschland - Wo der Krebs wuchert **2012** (zitiert vom 25. 10. 2014) <<http://sz.de/1.1447229>>.
- Kubes** P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit good in all of us. *Gut.* **2000**; 47:6–9.
- Ladue-Miller** T, Price GS, Page RL, Thrall DE. Radiotherapy of canine non-tonsillar squamous cell carcinoma. *Vet Radiol Ultrasound.* **1996**;37:74–7.
- LaRue** SM, Gillette EL. Radiation Therapy In: Withrow SJ, MacEwen EG, Hrsg. Small animal clinical oncology, 2nd Edition. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company; **1996**. p. 87–96.
- LaRue** SM, Gillette EL. Radiation Therapy In: Withrow SJ, MacEwen EG, Hrsg. Small animal clinical oncology, 4th Edition. Canada: Saunders Elsevier; **2007**. p. 193–210.
- Leitão** RFC, Ribeiro RA, Bellaguarda EAL, Silva JV, Gomes AS, Lima-Júnior RC et al. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2007**;59:603–12.

**Leitão** RFC, Brito G, Oria RB, Braga-Neto MB, Bellaguarda EA, Silva JV et al. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterol.* **2011**;11:1–10.

**Liptak** M, Dernell WS, Lascelles BDX et al. Intraoperative extracorporeal irradiation for limb sparing in 13 dogs. *Vet Surg.* **2004**;33:446–56.

**Liptak** M, Withrow SJ. Cancer of the gastrointestinal tract. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology 4th edn. Saunders Elsevier; **2007**. p. 455–75.

**Lord** LK, Yaissle JE, Marin L, Couto CG. Results of a web-based health-survey of retired racing greyhounds. *J Vet Int Med.* **2007**;21:1243–50.

**Ludewig** E, Krastel D, Buchholz J. Röntgen zur Metastasensuche! ...oder kann die bildgebende Diagnostik mehr bieten? LBH:Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress; 2010 Jan 21–23; Leipzig: Leipziger Universitätsverlag GmbH; **2010**.

**MacMillan** R, Withrow SJ, Gillette EL. Surgery and regional irradiation for treatment of canine tonsillar squamous cell carcinoma: retrospective review of eight cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* **1982**;18:311–14.

**Mayer** MN, Anthony JM. Radiation therapy for oral tumors: Canine acanthomatous ameloblastoma. *Can Vet J.* **2007**;48:99–101.

**McDonald** C, Looper J, Greene S. Response rate and duration associated with a 4 Gy 5 fraction palliative radiation protocol. *Vet Radiol Ultrasound.* **2012**;53:358–64.

**McEntee** MC, Page RL, Theon A, Erb HN, Thrall DE. Malignant tumor formation in dogs previously irradiated for acanthomatous epulis. *Vet Radiol Ultrasound.* **2004**;45:357–61.

**McKnight** JA, Mauldin GN, McEntee MC, Meleo KA, Patnaik AK. Radiation treatment for incompletely resected soft-tissue sarcomas in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **2000**;217:205–10.

**McMahon** SB, Cafferty WBJ, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol.* **2005**;192:444–62.

**Mestrinho** LA, Bernado E, Nizza MMRE, Lloret A, Buracco P. Neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery as treatment for oral maxillary squamous cell carcinoma in a dog. *Aust Vet J.* **2012**;90:264–8.

**Misdorp** W, Schmidt J, Kessler M. Ätiologie und Pathologie von Krebserkrankungen. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze. 3. Aufl. Stuttgart: Parey Buchverlag; **2013**. p. 2–13.

**Moncada** S, Palmer RMJ, Hibbs JR. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* **1991**;43:109–42.

**Moore AS.** Treatment choices for oral cancer in cats: What is possible? What is reasonable? *J Feline Med Surg.* **2009**;11:23–31.

**Müller S,** Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotektion durch vaskuläres NO. MMP-Übersicht. **2002**;2:45–51.

**Murphy S,** Hayes AM, Blackwood L, Maglennon G, Pattinson H, Sparkes AH. Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Vet Comp Oncol.* **2005**;3:222–9.

**Nagel ML.** Tumoren des Skeletts. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; **2005.** p. 389–410.

**Nathan C,** Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* **1994a**;269:13725–28.

**Nathan C,** Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tools and controls. *Cell.* **1994b**;78:915–8.

**Nemec A,** Pavlica Z, Crossley DA, entjunc M, Jerin A, Eren D et al. Chronic ingestion of *Porphyromonas gingivalis* induces systemic nitric oxide response in mice. *Oral Mikrobiol Immunol.* **2009**;24:204–10.

**Nemec A,** Pavlica Z, Petelin M, Crossley DA, Sentjunc M, Jerin A. Systemic use of selective iNOS inhibitor 1400W or non-selective NOS inhibitor L-NAME differently affects systemic nitric oxide formation after oral *Porphyromonas gingivalis* inoculation in mice. *Arch Oral Biol.* **2010**;55:509–14.

**Neuberger T.** Radiosynoviorthese - Ein neuer Therapieansatz zur Behandlung von entzündlich-rheumatischen und degenerativen Gelenkerkrankungen in der Kleintiermedizin. *Prakt Tierarzt.* **2005**;86:310–8.

**Nickstadt T.** Kapazität und Kinetik der Erholung von subletalen Strahlenschäden in der Mundschleimhaut (Maus) bei Bestrahlung mit 200 kV Röntgenstrahlen.[Dissertation med. dent].Dresden: Med. Fakultät Carl Gustav Carus TU Dresden; **2000.**

**North SM,** Banks TA. The human-animal bond and why veterinary oncology is important. In: North SM, Banks TA, Hrsg. Small animal oncology: an introduction. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Saunders Elsevier; **2009a.** p. 1–3.

**North SM, Banks TA.** Principles of radiation oncology. In: North SM, Banks TA, Hrsg. Small animal oncology: an introduction. Edingburgh, London, New york, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydnex, Toronto: Saunders Elsevier; **2009b**. p. 45–52.

**North SM, Banks TA.** Principles of chemotherapy. In: North SM, Banks TA, Hrsg. Small animal oncology: an introduction. Edingburgh, London, New york, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydnex, Toronto: Saunders Elsevier; **2009c**. p. 31–43.

**North SM, Banks TA.** Tumours of head and neck. In: North SM, Banks TA, Hrsg. Small animal oncology: an introduction. Edingburgh, London, New york, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydnex, Toronto: Saunders Elsevier; **2009d**. p. 91–114.

**Northrup NC, Roberts RE, Harrell TW, Allen KL, Howerth EW, Gieger TL.** Iridium-192 interstitial brachytherapy as adjunctive treatment for canine cutaneous mast cell tumors. J Am Anim Hosp Assoc. **2004**;40:309–15.

**Northrup NC, Selting KA, Rassnick KM, Kristal O, O'Brien MG, Dank G et al.** Outcomes of cats with oral tumors treated with mandibulectomy: 42 Cases. J Am Anim Hosp Assoc. **2006**;42:350–60.

**Nowak M, Madej JA, Ciaputa R, Poradowski D.** Manifestation of tumours in domestic animals in lower silesia in 2005-2008. Bull Vet Inst Pulawy. **2010**;54:229–36.

**Nozaki Y, Hasegawa Y, Takeuchi A, Fan ZH, Isobe KI, Nakashima I et al.** Nitric oxide as an inflammatory mediator of radiation pneumonitis in rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **1997**;272:L651–8.

**Ogama N, Suzuki S.** Adverse effects and appetite supression associated with particle beam therapy in patients with head and neck cancer. Jpn J Nurs Sci. **2012**;9:28–37.

**Pabst S, Spekl K, Dörr W.** Changes in the effect of dose fractionation during daily fractionated irradiation: Studies in mouse oral mucosa. Int J Rad Oncol Biol Phys. **2004**;48:485–92.

**Packer RA, Freeman LJ, Miller MA, Fauber E, Morrison WB.** Evaluation of minimally invasive excisional brain biopsy and intracranial brachytherapy catheter placement in dogs. Am J Vet Res. **2011**;72:109–21.

**Perez-Ruiz A, Montes R, Velasco F, Lopez-Pedraza C, Páramo JA, Orbe J.** Regulation by nitric oxide of endotoxin-induced tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in endothelial cells. Thromb Haemost. **2002**;88:1060–5.

**Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M.** Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. Antioxid Redox Signal. **2006**;8:949–54.

**Petcancercenter.org.** Veterinary Oncologists **2014** (zitiert vom 26. 10. 2014) <<http://www.petcancercenter.org/VeterinaryOncologistsEurope.html>>

**Pommer A**, Mahling W. Roentgen epilation and erythema doses of the skin in the dog. *North Am Veterinarian*. **1937**;18:39–58.

**Poyton HG**. The effects of radiation on teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. **1986**;26:639–46.

**Proulx DR**, Ruslander DM, Dogde RK, Hauck ML, Williams LE, Horn B. A retrospective analyses of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet Radiol Ultrasound*. **2003**;44:352–9.

**Proschowsky HF**, Rugbjerg H, Ersboll AK. Morbidity of purebred dogs in denmark. *Prev Vet Med*. **2003**;58:53–62.

**Pyykönen H**, Malmström M, Oikarinen VJ, Salmo M, Vehkalahti M. Late effects of radiation treatment of tongue and floor-of-mouth cancer on the dentition, saliva secretion, mucous membranes and the lower jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg*. **1986**;15:401–19.

**Raber-Durlacher JE**, Elad S, Barasch A. Oral mucositis. *Oral Oncol*. **2010**;46:452–6.

**Riesenbeck D**, Reimann P, Adamietz IA. Prophylaxe und Behandlung von Nebenwirkungen der Strahlentherapie. *Onkologe*. **2013**;19:267–78.

Robert-Koch-Institut(**RKI**). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zu Gesundheitsberichterstattung des Bundes **2010**(zitiert vom 26. 10. 2014)

<<http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Praevalenzbroschuere/praevalenzbroschuerenode.html>>

Robert-Koch-Institut (**RKI**), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (**GEKID**) Krebs in Deutschland 2009/2010. Berlin, 9. Auflage; **2013**. p. 187–201.

Robert-Koch-Institut(**RKI**). Krebs in Deutschland **2014** (zitiert vom 26. 10. 2014) <<http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/KrebsinDeutschland/kid2013/kid2013c00-14mundhoehlerachen.pdf?blob=publicationFile>>

**Roeder F**, Leowardi C, Weitz J. Intraoperative Strahlentherapie. In: Schlag PM et al, Hrsg. Weichgewebetumoren. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag; **2011**. p. 187–201.

**RohrerBley C**. Krebserkrankungen bei Hunde und Katze. Teil 1. Schweizer Hunde Magazin. **2007**;4:33–7.

**Rosenthal DI**, Trotti A. Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol*. **2009**;19:29–34.

**Ruppert R**, Seegenschmiedt MH, Sauer R. Radiotherapie von Arthrosen-Indikation, Technik, klinische Ergebnisse. Orthopädie. **2004**;33:56–62.

**SAS**. SAS/STAT User's Guide, Version 9., Cary, N.2.-8. USA: SAS Institute Inc. **1990**.

**SAS**. SAS® Universal Viewer 1.3: User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. **2012**.

**Sauer R**, Keilholz L. Akute und chronische Toxizität der Strahlentherapie In: Kompendium Internistische Onkologie, Standards in Diagnostik und Therapie. Berlin, Heidelberg: Springer; **2006**. p. 635–50.

**Scardina GA**, Pisano P, Messina P. Oral mucositis, review of literature. N Y State Dent J. **2010**;34–8.

**Schmidt HHHW**, Walter U. NO at work. Cell. **1994**;78:919–25.

**Schneider R**. Epidemiologic studies of cancer in man and animals sharing the same environment. Proc. 3rd Int. Symposium of the detection and prevention of cancer; 1976 New York; **1976**.

**Schroeder HE**. Orale Strukturbiologie. Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks. 5. Aufl. Stuttgart, New York: George Thieme; **2000**.

**Schweyen R**, Hey J, Fränzel W, Vordermark D, Hildebrandt G, Kuhnt T. Radiogene Karies: Ätiologie und Möglichkeiten der Prävention. Was sollte der Strahlentherapeut wissen? Strahlenther Onkol. **2012**;188:21–8.

**Seegenschmiedt MH**, Zimmermann JS. Dokumentation von Nebenwirkungen In: Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt JS, Hrsg. Nebenwirkungen in der Radioonkologie. München: Urban&Vogel. **2000**. p. 45–72.

**Simon D**, Ruslander DM, Rassnick KM et al. Orthovoltage radiation and weekly low dose of doxorubicin for the treatment of incompletely excised soft-tissue sarcomas in 39 dogs. Vet Rec. **2007**;160:321–6.

**Somers RH**. A new asymmetric measure of association for ordinal variables. Am Sociol Rev. **1962**;27:799–811.

**Sonis ST**. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. Oral Oncol. **2009**;45:1015–20.

**Sonis ST**. Oral mucositis. Anticancer Drugs. **2011**;22:607–12.

**Stebbins KE**, Morse CC, Goldschmidt MH. Feline oral neoplasia: A ten-year survey. Vet Pathol. **1989**;26:121–8.

**Steel** GG. Basic Clinical Radiobiology 3. Aufl. London: Arnold Publishers; **2002**. p. 58–63.

**Sturm** P. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Modifikation der strahleninduzierten Mucositis enoralis (Maus) durch den Immunmodulator JBT3002 [Dissertation. med. dent]. Dresden: TU Dresden; **2007**.

**Takeda** I, Kizu Y, Yoshitaka O, Saito I, Yamane GY. Possible role of nitric oxide in radiation-induced salivary gland dysfunction. *Radiat Res.* **2003**;159:465–70.

**Thames** HD, Withers HR, Peters LJ, Fletcher GH. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: implications for dose-survival relationships. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **1982**;8:219–26.

**Thippeswamy** T, McKay JS, Quinn JP, Morris R. Nitric oxide, a biological double-faced-janus- Is this good or bad? *Histol Histopathol.* **2006**;21:445–58.

**Thompson** JP, Ackermann N, Bellah JR, Beale BS, Ellison GW. <sup>192</sup>Iridium brachytherapy, using an intracavitary afterload device, for treatment of intranasal neoplasm in dogs. *Am J Vet Res.* **1992**;53:617–22.

**Thorpe-Vagas** S. Canine cancer epidemic **2013** (zitiert vom 27. 10. 2014)  
<<http://www.thedogplace.org/HEALTH/Cancer-phytochemicals-ellagic-acid-Dr.Vargas-0611.asp>>

**Thrall** DE. Orthovoltage radiotherapy of oral fibrosarcomas in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **1981**;179:159–62.

**Trott** KR, Herrmann TH, Dörr W. Allgemeine Pathogenese akuter Strahlenfolgen. In: Trott KR, Herrmann TH, Dörr W, Hrsg. Strahlenwirkungen auf Normalgewebe. München: Urban & Vogel; **2002**. p. 9–15.

**Ulrich** J, Hartmann JT, Dörr W, Ugurel S. Hauttoxizität durch antitumorale Therapie. *J Dtsch Dermatol Ges.* **2008**;6:959–77.

**Van der Schueren** E, van den Bogaert W, Vanuytsel L, Van Limbergen E. Radiotherapy by multiple fractions per day (MFD) in head and neck cancer: acute reactions of skin and mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **1990**;19:301–31.

**Vardareli** E, Dundar E, Angin K, SARICAM T, Inal M. Effects of intrarectal and intraperitoneal N(G)-nitro-L-arginine methyl ester treatment in 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid induced colitis in rats. *Exp Toxic Pathol.* **2003**;55:271–6.

**Vascellari** M, Baioni E, Ru G, Carminato A, Mutinelli M. Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Vet Res.* **2009**;5:39–48.



---

VeterinaryCancerSociety(**VCS**). Radiation facilities **2014** (zitiert vom 20. 10. 2014) <<http://www.vetcancersociety.org/members/files/2014/04/radiation-facilities.pdf>>.

Veterinary Society of Surgical Oncology(**VSSO**). Radiation facilities **2014** (zitiert vom 20. 10. 2014) <<http://www.vssso.org/RadiationFacilitiesEUR.html>>.

**Wallace** J, Matthiesen DT, Patnaik AK. Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumours in 69 dogs. *Vet Surg.* **1992**;21:337–41.

**Warnakulasuriya** K, MacDonald D. Diurnal variation in labelling index in human buccale epithelium. *Arch Oral Biol.* **1993**;38:1107–11.

**White** R, Walker M, Legendre AM, Hoopes J, Smith J, Horton SB. Developement of brachytherapy technique for nasal tumors in dogs. *Am J Vet Res.* **1990**;51:1250–6.

**Wikimedia**. Strahlentherapie **2014** (zitiert vom 20. 10. 2014) <<http://de.wikipedia.org/wiki/Strahlentherapie>>.

**Willett** CG, Czito BG, Tyler DS. Intraoperative radiotion therapy. *J Clin Oncol.* **2007**;25:971–7.

**Withers** HR, Taylor JM, Maciewski B. Treatment volume and tissue tolerance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **1988**;14:751–9.

**Wright** ZM, Rogers KS, Mansell J. Survival data for canine oral extramedullary plasmacytome: a retrospective analysis (1996-2006). *J Am Anim Hosp Assoc.* **2008**;44:75–81.

# A. Anhang

## SPF-Bedingungen im Experimentellen Zentrum

Die Mäuse wurden während der Versuche unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten.

### Geteste Mikroorganismen:

#### *Bakterien und Pilze:*

- Bordetella bronchiseptica
- Citrobacter rhodentium
- Clostridium piliformae
- Corynebacterium kutscheri
- E. coli
- Helicobacter spp.
- Klebsiella oxytoca
- Klebsiella pneumoniae
- Mycoplasma spp.
- Pasteurellaceae
- Proteus spp.
- Pseudomonas aeruginosa
- Salmonella sp.
- Staphylococcus aureus
- Streptobacillus moniliformis
- Streptococcus pneumoniae
- $\beta$ -hämolisierende Streptococcus-Arten

#### *Viren:*

- MHV (Mäusehepatitisvirus)
- Reo3 (Reovirus Typ 3)
- TMEV (Theilersches Encephalomyelitisvirus der Maus)
- PVM (Pneumovirus der Maus)
- Sendaviruses
- MVM (Minute Virus of Mice)
- Ektromelie

- LCM (Virus der lymphozytären Choriomeningitis)
- MAd (Adenovirus der Maus)
- EDIM (Rotavirus der Maus)
- MPV (Mouse Parvo Virus)
- MCMV (Zytomegalievirus der Maus)

*Parasiten:*

- Aspicularis sp.
- Syphacia sp.
- Coccidien
- Giardia sp.
- Spironucleus muris
- Chilomastix sp.
- sonstige Flagellaten, Arthropoden, Trichomonaden, Nematoden, Ektoparasiten, Endoparasiten

## **Reagenzien der HE-Färbung für die Paraffinschnitte**

- 0,5 % Eosinlösung (100 ml 1 4% alkoholische Eosinlösung auf 100 ml Ethanol 96 %)
- Xylol zum Entparaffinieren der Schnitte
- Absteigende Alkoholreihe zum Hydratisieren (Ethanol absolutus, Ethanol absolutus, Ethanol 96 %, Ethanol 96 %, Ethanol 70 %, Ethanol 40 %)
- Mayers Hämalun (1g Hämatoxylin in 1 l Aqua dest., 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure)
- Entellan (Entellan®neu, Merck KGaA, Darmstadt)

## Histologische Untersuchungen

In Tabelle 13 sind die relative und absolute Zellzahl aller untersuchten Epithelschichten des Versuches H0 aufgelistet. Die Zellzahl pro Entnahmetag ist der Mittelwert (MW) von jeweils 5 Tieren.

Tabelle 13: Veränderung der absoluten Zellzahl (MW/mm) und relativen Zellzahl (%) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen

Tag	Zellzahl					
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	MW/mm ( $\pm$ SEM)	% ( $\pm$ SEM)	MW/mm ( $\pm$ SEM)	% ( $\pm$ SEM)	MW/mm ( $\pm$ SEM)	% ( $\pm$ SEM)
0	360( $\pm$ 19)	100 ( $\pm$ 5)	258( $\pm$ 14)	100( $\pm$ 5)	103( $\pm$ 6)	100( $\pm$ 5)
1	352( $\pm$ 12)	98( $\pm$ 3)	248( $\pm$ 9)	96( $\pm$ 3)	104( $\pm$ 5)	101( $\pm$ 5)
3	321( $\pm$ 6)	89( $\pm$ 2)	229( $\pm$ 4)	89( $\pm$ 2)	89( $\pm$ 2)	87( $\pm$ 2)
5	269( $\pm$ 9)	74( $\pm$ 3)	200( $\pm$ 5)	78( $\pm$ 2)	68( $\pm$ 4)	66( $\pm$ 4)
7	332( $\pm$ 12)	92( $\pm$ 3)	231( $\pm$ 7)	89( $\pm$ 3)	100( $\pm$ 6)	97( $\pm$ 5)
9	270( $\pm$ 8)	75( $\pm$ 2)	193( $\pm$ 7)	75( $\pm$ 3)	77( $\pm$ 3)	75( $\pm$ 3)
11	254( $\pm$ 13)	70( $\pm$ 4)	177( $\pm$ 7)	69( $\pm$ 3)	75( $\pm$ 6)	73( $\pm$ 6)
13	301( $\pm$ 4)	84( $\pm$ 1)	214( $\pm$ 4)	83( $\pm$ 1)	85( $\pm$ 6)	83( $\pm$ 6)
15	387( $\pm$ 8)	107( $\pm$ 2)	252( $\pm$ 7)	98( $\pm$ 3)	136( $\pm$ 4)	132( $\pm$ 4)
17	412( $\pm$ 7)	114( $\pm$ 2)	268( $\pm$ 4)	104( $\pm$ 2)	145( $\pm$ 3)	141( $\pm$ 3)
19	456( $\pm$ 22)	126( $\pm$ 6)	330( $\pm$ 11)	129( $\pm$ 4)	127( $\pm$ 13)	123( $\pm$ 12)
21	416( $\pm$ 8)	115( $\pm$ 2)	293( $\pm$ 9)	114( $\pm$ 4)	122( $\pm$ 6)	119( $\pm$ 6)
23	347( $\pm$ 5)	96( $\pm$ 2)	240( $\pm$ 4)	93( $\pm$ 2)	107( $\pm$ 4)	105( $\pm$ 4)
25	390( $\pm$ 12)	108( $\pm$ 3)	264( $\pm$ 9)	102( $\pm$ 3)	126( $\pm$ 5)	123( $\pm$ 4)

In Tabelle 14 sind die relative und absolute Zellzahl aller untersuchten Epithelschichten des Versuches H1 (fraktionierte Bestrahlung mit L-NAME-Applikation von Tag -3 bis Tötung) aufgelistet. Die Zellzahl pro Entnahmetag ist der Mittelwert (MW) von jeweils 5 Tieren.

Tabelle 14: Veränderung der absoluten Zellzahl (MW/mm) und relativen Zellzahl (%) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen mit L-NAME

	Zellzahl					
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
Tag	MW/mm ( $\pm$ SEM)	% ( $\pm$ SEM)	MW/mm ( $\pm$ SEM)	% ( $\pm$ SEM)	MW/mm ( $\pm$ SEM)	% ( $\pm$ SEM)
0	360( $\pm$ 19)	100 ( $\pm$ 5)	258( $\pm$ 14)	100( $\pm$ 5)	103( $\pm$ 6)	100( $\pm$ 5)
1	320( $\pm$ 20)	89( $\pm$ 6)	222( $\pm$ 17)	86( $\pm$ 6)	89( $\pm$ 4)	87( $\pm$ 3)
3	303( $\pm$ 9)	84( $\pm$ 5)	211( $\pm$ 6)	82( $\pm$ 2)	92( $\pm$ 4)	90( $\pm$ 4)
5	279( $\pm$ 11)	77( $\pm$ 3)	207( $\pm$ 13)	80( $\pm$ 5)	69( $\pm$ 3)	67( $\pm$ 3)
7	314( $\pm$ 8)	87( $\pm$ 2)	221( $\pm$ 4)	86( $\pm$ 2)	92( $\pm$ 5)	90( $\pm$ 5)
9	294( $\pm$ 4)	82( $\pm$ 1)	211( $\pm$ 3)	82( $\pm$ 1)	82( $\pm$ 2)	80( $\pm$ 2)
11	296( $\pm$ 15)	82( $\pm$ 4)	209( $\pm$ 12)	81( $\pm$ 5)	87( $\pm$ 5)	85( $\pm$ 5)
13	313( $\pm$ 18)	87( $\pm$ 5)	226( $\pm$ 11)	88( $\pm$ 4)	88( $\pm$ 7)	85( $\pm$ 7)
15	407( $\pm$ 10)	113( $\pm$ 3)	295( $\pm$ 3)	114( $\pm$ 1)	112( $\pm$ 9)	110( $\pm$ 9)
17	428( $\pm$ 3)	119( $\pm$ 1)	277( $\pm$ 3)	107( $\pm$ 1)	155( $\pm$ 3)	151( $\pm$ 3)
19	464( $\pm$ 10)	129( $\pm$ 3)	314( $\pm$ 7)	122( $\pm$ 3)	150( $\pm$ 4)	146( $\pm$ 4)
21	412( $\pm$ 21)	114( $\pm$ 6)	265( $\pm$ 14)	103( $\pm$ 6)	149( $\pm$ 7)	145( $\pm$ 7)
23	371( $\pm$ 19)	103( $\pm$ 5)	259( $\pm$ 18)	101( $\pm$ 7)	128( $\pm$ 17)	125( $\pm$ 17)
25	386( $\pm$ 10)	107( $\pm$ 3)	253( $\pm$ 11)	98( $\pm$ 4)	133( $\pm$ 2)	130( $\pm$ 2)

In der Tabelle 15 sind die relative und absolute Epitheldicke (D) aller untersuchten Epithelschichten des Versuches H0 aufgelistet. Die Epitheldicke pro Entnahmetag ist der Mittelwert von jeweils 5 Tieren.

Tabelle 15: Veränderung der absoluten Epitheldicke (D) und relativen Epitheldicke (%) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen

Epitheldicke									
Gesamtepithel				Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
Tag	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]	D( $\pm$ SEM) [%]	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]	D( $\pm$ SEM) [%]	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]	D( $\pm$ SEM) [%]	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]	D( $\pm$ SEM) [%]	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]
0	80( $\pm$ 3)	100( $\pm$ 4)	19( $\pm$ 1)	100( $\pm$ 3)	45( $\pm$ 2)	100( $\pm$ 5)	16( $\pm$ 2)	100( $\pm$ 10)	
1	76( $\pm$ 6)	95( $\pm$ 7)	19( $\pm$ 3)	98( $\pm$ 13)	41( $\pm$ 2)	90( $\pm$ 5)	16( $\pm$ 6)	2( $\pm$ 11)	
3	87( $\pm$ 5)	108( $\pm$ 6)	20( $\pm$ 1)	101( $\pm$ 4)	44( $\pm$ 3)	98( $\pm$ 6)	23( $\pm$ 2)	146( $\pm$ 12)	
5	73( $\pm$ 7)	90( $\pm$ 9)	17( $\pm$ 2)	90( $\pm$ hh)	32( $\pm$ 4)	70( $\pm$ 8)	24( $\pm$ 2)	153( $\pm$ 14)	
7	84( $\pm$ 8)	105( $\pm$ 10)	20( $\pm$ 2)	102( $\pm$ 8)	41( $\pm$ 6)	90( $\pm$ 13)	22( $\pm$ 2)	140( $\pm$ 14)	
9	69( $\pm$ 5)	85( $\pm$ 7)	17( $\pm$ 2)	88( $\pm$ 10)	33( $\pm$ 3)	74( $\pm$ 6)	18( $\pm$ 1)	115( $\pm$ 9)	
11	83( $\pm$ 10)	103( $\pm$ 13)	19( $\pm$ 2)	97( $\pm$ 13)	43( $\pm$ 6)	95( $\pm$ 13)	83( $\pm$ 3)	134( $\pm$ 17)	
13	85( $\pm$ 10)	106( $\pm$ 12)	22( $\pm$ 2)	113( $\pm$ 11)	38( $\pm$ 6)	84( $\pm$ 14)	21( $\pm$ 3)	131( $\pm$ 16)	
15	79( $\pm$ 2)	98( $\pm$ 3)	18( $\pm$ 1)	91( $\pm$ 3)	40( $\pm$ 1)	88( $\pm$ 1)	19( $\pm$ 1)	121( $\pm$ 5)	
17	83( $\pm$ 3)	104( $\pm$ 3)	21( $\pm$ 1)	107( $\pm$ 4)	43( $\pm$ 2)	94( $\pm$ 4)	20( $\pm$ 1)	126( $\pm$ 8)	
19	78( $\pm$ 3)	97( $\pm$ 3)	20( $\pm$ 1)	104( $\pm$ 4)	39( $\pm$ 2)	86( $\pm$ 5)	19( $\pm$ 1)	121( $\pm$ 6)	
21	83( $\pm$ 3)	103( $\pm$ 4)	18( $\pm$ 1)	93( $\pm$ 8)	44( $\pm$ 3)	98( $\pm$ 6)	22( $\pm$ 1)	136( $\pm$ 5)	
23	81( $\pm$ 3)	101( $\pm$ 4)	21( $\pm$ 0)	106( $\pm$ 2)	42( $\pm$ 1)	93( $\pm$ 3)	19( $\pm$ 2)	116( $\pm$ 11)	
25	90( $\pm$ 1)	112( $\pm$ 2)	19( $\pm$ 1)	100( $\pm$ 6)	50( $\pm$ 1)	111( $\pm$ 3)	23( $\pm$ 1)	141( $\pm$ 5)	

In Tabelle 16 sind die relative und absolute Epitheldicke (D) aller untersuchten Epithelschichten des Versuches H1 (fraktionierte Bestrahlung mit L-NAME-Applikation von Tag -3 bis Tötung aufgelistet. Die Epitheldicke pro Entnahmetag ist der Mittelwert von jeweils 5 Tieren.

Tabelle 16: Veränderung der absoluten Epitheldicke (D) und relativen Epitheldicke (%) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen (mit L-NAME-Applikation)

Epitheldicke									
Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht			
Tag	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]	D( $\pm$ SEM) [%]	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]	D( $\pm$ SEM) [%]	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]	D( $\pm$ SEM) [%]	D( $\pm$ SEM) [ $\mu$ ]	D( $\pm$ SEM) [%]	
0	80( $\pm$ 3)	100( $\pm$ 4)	19( $\pm$ 1)	100( $\pm$ 3)	45( $\pm$ 2)	100( $\pm$ 5)	16( $\pm$ 2)	100( $\pm$ 10)	
1	76( $\pm$ 1)	94( $\pm$ 2)	16( $\pm$ 1)	82( $\pm$ 6)	45( $\pm$ 2)	99( $\pm$ 4)	15( $\pm$ 0)	96( $\pm$ 3)	
3	72( $\pm$ 4)	90( $\pm$ 5)	14( $\pm$ 1)	74( $\pm$ 6)	42( $\pm$ 3)	93( $\pm$ 6)	16( $\pm$ 1)	100( $\pm$ 8)	
5	67( $\pm$ 3)	84( $\pm$ 4)	14( $\pm$ 2)	71( $\pm$ 8)	33( $\pm$ 3)	74( $\pm$ 6)	18( $\pm$ 1)	114( $\pm$ 9)	
7	75( $\pm$ 4)	94( $\pm$ 5)	19( $\pm$ 1)	97( $\pm$ 4)	38( $\pm$ 1)	84( $\pm$ 3)	19( $\pm$ 3)	119( $\pm$ 17)	
9	73( $\pm$ 1)	91( $\pm$ 4)	19( $\pm$ 1)	96( $\pm$ 5)	34( $\pm$ 3)	75( $\pm$ 7)	21( $\pm$ 1)	130( $\pm$ 7)	
11	76( $\pm$ 1)	95( $\pm$ 2)	18( $\pm$ 1)	95( $\pm$ 4)	37( $\pm$ 1)	81( $\pm$ 1)	21( $\pm$ 1)	134( $\pm$ 7)	
13	77( $\pm$ 10)	95( $\pm$ 12)	19( $\pm$ 2)	100( $\pm$ 10)	38( $\pm$ 6)	84( $\pm$ 14)	20( $\pm$ 2)	125( $\pm$ 13)	
15	92( $\pm$ 4)	115( $\pm$ 5)	22( $\pm$ 2)	112( $\pm$ 10)	46( $\pm$ 3)	102( $\pm$ 6)	25( $\pm$ 2)	154( $\pm$ 10)	
17	92( $\pm$ 4)	114( $\pm$ 4)	20( $\pm$ 1)	105( $\pm$ 3)	49( $\pm$ 3)	109( $\pm$ 6)	22( $\pm$ 1)	139( $\pm$ 8)	
19	78( $\pm$ 4)	98( $\pm$ 5)	18( $\pm$ 1)	94( $\pm$ 7)	43( $\pm$ 3)	95( $\pm$ 6)	17( $\pm$ 1)	109( $\pm$ 5)	
21	87( $\pm$ 2)	108( $\pm$ 3)	21( $\pm$ 0)	109( $\pm$ 1)	44( $\pm$ 2)	96( $\pm$ 4)	22( $\pm$ 2)	140( $\pm$ 10)	
23	83( $\pm$ 3)	104( $\pm$ 4)	19( $\pm$ 1)	96( $\pm$ 3)	44( $\pm$ 2)	98( $\pm$ 8)	20( $\pm$ 2)	128( $\pm$ 7)	
25	85( $\pm$ 6)	106( $\pm$ 8)	20( $\pm$ 1)	105( $\pm$ 7)	44( $\pm$ 4)	98( $\pm$ 8)	20( $\pm$ 2)	126( $\pm$ 11)	

# Abbildungsverzeichnis

1	Zellüberlebenskurve nach Einzeit- (EB) und fraktionierter Bestrahlung (FB) (modifiziert nach HERRMANN et al. 2006a) . . . . .	24
2	Histologischer Aufbau des mehrschichtigen verhornenden Plattenepithels der Zungenunterseite der Maus (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) .	30
3	Reaktionsgleichung der NO-Synthese . . . . .	33
4	Regelkreis der NO-Synthese a) physiologische Bedingungen b) unter Einfluss von ionisierender Strahlung oder LPS/Zytokine (modifiziert nach PERSCHINI et al. 2006) . . . . .	34
5	Strukturformel L-NAME . . . . .	35
6	Plexiglasplatte zur Fixierung der Tiere und Positionierung der Mäuseschnauzen während der perkutanen Bestrahlung . . . . .	39
7	Vorrichtung zur lokalen Bestrahlung . . . . .	41
8	Ulzerative Läsion der Zungenunterseite am Tag 10 nach lokaler Bestrahlung mit 17 Gy . . . . .	49
9	Latenzzeit in Abhängigkeit von der Strahlendosis . . . . .	50
10	Ulkusdauer in Abhängigkeit von der Strahlendosis . . . . .	50
11	Ulkusprävalenz nach Einzeitbestrahlung (KE) . . . . .	51
12	Dosisabhängigkeit der Ulkusinzidenz nach alleiniger Einzeitbestrahlung	52
13	Gewichtsverlauf nach alleiniger Einzeitbestrahlung . . . . .	52
14	Gewichtsverlauf nach alleiniger L-NAME-Applikation . . . . .	53
15	Dosisabhängigkeit der Ulkusinzidenz nach lokaler Einzeitbestrahlung	54
16	Ulkusprävalenz nach lokaler Zungenbestrahlung mit L-NAME-Applikation zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zur alleinigen lokalen Zungenbestrahlung . . . . .	55
17	Dosis-Effekt-Kurven der einwöchig fraktioniert bestrahlten Versuchsgruppen . . . . .	56
18	Ulkusprävalenz nach einwöchig-fraktionierter perkutaner Schnauzenbestrahlung plus Testbestrahlung . . . . .	57
19	ED <sub>50</sub> -Werte nach einwöchiger fraktionierter Bestrahlung plus Testbestrahlung . . . . .	59
20	Ulkusinzidenz nach zweiwöchig-fraktionierter perkutaner Schnauzenbestrahlung . . . . .	60
21	Vergleich der Mukosa bei alleiniger fraktionierter Bestrahlung und nach Applikation von L-NAME zu verschiedenen Zeitpunkten der Nachbeobachtungsphase . . . . .	61
22	Zellzahlen der Schleimhautschichten unter 5×3 Gy/Woche über 2 Wochen und in den folgenden Nachbeobachtungstagen . . . . .	63



- 23 Epitheldicke der einzelnen Schichten unter  $5 \times 3$  Gy/Woche über 2  
Wochen fraktionierter Bestrahlung und den Nachbeobachtungstagen . 65

## Tabellenverzeichnis

1	Strahlentherapie caniner Tumoren der Maulhöhle . . . . .	12
2	Strahlentherapie feline Tumoren der Maulhöhle . . . . .	15
3	Klinische Parameter zur Beurteilung der Strahlenreaktionen . . . . .	42
4	Übersicht über die durchgeführten Versuche . . . . .	43
5	Protokoll zur Färbung der HE-Schnitte . . . . .	47
6	Zeitlicher Verlauf nach der alleinigen Einzeitbestrahlung . . . . .	49
7	Ergebnisse der Einzeitbestrahlung ohne und mit L-NAME-Gabe . . .	54
8	Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung ohne und mit L-NAME . .	56
9	Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung ohne und mit L-NAME . .	58
10	Charakteristika des unbestrahlten Zungenepithels . . . . .	62
11	Veränderung der absoluten und relativen Zellzahlen (Gesamtepithel) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeob- achtungstagen . . . . .	64
12	Veränderung der absoluten und relativen Gesamtepitheldicke wäh- rend fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobach- tungstagen . . . . .	66
13	Veränderung der absoluten Zellzahl (MW/mm) und relativen Zell- zahl (%) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen . . . . .	100
14	Veränderung der absoluten Zellzahl (MW/mm) und relativen Zell- zahl (%) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen mit L-NAME . . . . .	101
15	Veränderung der absoluten Epitheldicke (D) und relativen Epithel- dicke (%) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen . . . . .	102
16	Veränderung der absoluten Epitheldicke (D) und relativen Epithel- dicke (%) während fraktionierter Bestrahlung und in den folgenden Nachbeobachtungstagen(mit L-NAME-Applikation) . . . . .	103

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Dörr für die Überlassung des Themas und die allzeitige Hilfsbereitschaft während der Durchführung der experimentellen Datenerhebung und der Erstellung der Monografie.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Normalgewebsbiologie, insbesondere Frau Schmidt und Frau Stolz-Kieslich gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung während der Vorbereitung und Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit.

Mein Dank möchte ich auch an die Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität für die Erlaubnis zur Nutzung ihrer Einrichtung aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, welche mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben und mich auf allen Wegen unterstützen.

Umfangreicher Dank gilt auch meinem Freund für die alltägliche Unterstützung.